

Struktur-Funktionsanalysen prozessiver und nicht-prozessiver Myosine

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Ralph Diensthuber
geboren am 11.08.1981 in Wien

2009

Referent: Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris
Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer
Institut für Botanik, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 13.02.2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. September 2005 bis 31. Oktober 2008 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris angefertigt. Sie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW) im Rahmen des Doktoranden-Programms „DOC“ gefördert.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Ralph Diensthuber, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst zu haben. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Hannover, 18. November 2008

**Meinen Eltern und
Großeltern gewidmet**

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dietmar Manstein sowie Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris danke ich für die Ermöglichung der Durchführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris für die freundliche Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung sowie seine ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herzlicher Dank gilt meinem Kollegen Dr. Manuel Taft, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Einen hilfsbereiteren und kompetenteren Arbeitskollegen kann man sich nicht wünschen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Falk Hartmann, Daniela Kathmann, Agrani Rump, Claudia Thiel sowie Christian Waßmann für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke auch den Kooperationspartnern dieser Arbeit Frau Dr. Mamta Amrute-Nayak (Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover), Herrn Prof. Dr. Claus Urbanke (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover), Herrn Dr. Igor Chizov (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover), Herrn Dr. Walter Steffen (Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover) sowie Herrn Dr. Kazuhiro Oiwa (Kobe Advanced ICT Research Center, Kobe, Japan) für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Roman Fedorov (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) und Frau Petra Baruch (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) danke ich für die gewährte Unterstützung bei den kristallographischen Arbeiten.

Allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts sei an dieser Stelle für die Unterstützung und das produktive wissenschaftliche Umfeld gedankt.

Besonderer Dank gilt Caroline für die langjährige Freundschaft.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Marc und seiner Frau Julia sowie meinen Großeltern bedanken, die mich stets in all meinen Vorhaben unterstützt haben.

„Das Leben ist ein ewiges Werden. Geworden sein heißt töten.“

Christian Friedrich Hebbel (1813 – 1863)

ZUSAMMENFASSUNG

Prozessive Myosine sind durch eine dimere Struktur, lange Nackenregionen, die Kraft und Spannung zwischen den beiden Köpfen vermitteln, sowie eine hohe Verweildauer (*duty ratio*) in stark-Aktin-gebundenen Zuständen während der ATP-Umsetzung gekennzeichnet. Diese Eigenschaften ermöglichen es prozessiven Myosinen wie z. B. Myosin-5, sich in mehreren koordinierten Schritten entlang eines Aktinfilaments zu bewegen ohne von diesem zu dissoziieren. Im Gegensatz dazu binden nicht-prozessive Myosine wie Sklettmuskelmyosin-2 und einige monomere Klasse-1 Myosine an ein Aktinfilament, führen einen Schritt aus und dissoziieren anschließend schnell. Die kurze Assoziation mit dem Aktinfilament resultiert aus dem kleinen zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus, den diese Myosine in stark-Aktin-gebundenen Zuständen verbringen. Kinetische Studien haben gezeigt, dass prozessive und nicht-prozessive Myosine deutliche Unterschiede bestimmter Schritte des ATPase-Zyklus aufweisen. Trotzdem ist bis heute ungeklärt, wie strukturelle Elemente der Nukleotid- und Aktin-Bindungsregionen, mechanische Eigenschaften der Motordomäne und der Nackenregion sowie kinetische Parameter des ATPase-Zyklus zu dem Mechanismus prozessiver bzw. nicht-prozessiver Myosine beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem Struktur-basierten Protein-Konstruktionsansatz in Kombination mit molekularen Design-Studien der Nukleotidbindungsregion von Myosinen mit hoher bzw. niedriger *duty ratio* verschiedene Myosinkonstrukte generiert sowie kinetisch und funktional charakterisiert, um die strukturellen und funktionalen Anforderungen prozessiver Bewegung zu identifizieren und die Mechanismen zu untersuchen, welche Prozessivität regulieren.

Auf Basis von Sequenzvergleichen und strukturellen Betrachtungen der Nukleotidbindungstasche von Myosinen der Klassen 1, 2 und 5 wurde eine nicht-konservierte Aminosäure in Schalter-2 identifiziert, für die eine entscheidende Funktion in dem Mechanismus der ADP-Freisetzung und der Vermittlung der Mg^{2+} -Koordination postuliert wurde. Während Myosine mit hoher *duty ratio* wie *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b* in der Schalter-2 Konsensussequenz (DIYGFE) ein Tyrosin aufweisen, befindet sich bei Myosinen mit niedriger *duty ratio* wie *DdMyosin-1B* und *DdMyosin-2* an dieser Stelle ein Phenylalanin bzw. Serin. Um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der Motoren mit hoher *duty ratio* von solchen mit niedriger *duty ratio* unterscheidet, wurden Motordomänenkonstrukte generiert, in denen diese Aminosäure in Schalter-2 durch ein Phenylalanin bzw. Tyrosin ersetzt wurde. Da physiologische Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen die kinetischen Eigenschaften und die Motoraktivität von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen mit einem Tyrosin in Schalter-2, jedoch nicht von Klasse-1 und Klasse-2 Myosinen mit einer anderen Aminosäure an dieser Stelle, regulieren, wurde darüber hinaus untersucht, ob Schalter-2 und insbesondere diese Aminosäure die Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen vermitteln. Die umfangreiche kinetische Charakterisierung der Mutanten mittels zeitaufgelöster Spektroskopiemethoden zeigte, dass der Aminosäureaustausch in stark veränderten Nukleotidbindungseigenschaften der Myosine resultiert. Im Fall von Myosin-1B führt die Mutation zu einer Mg^{2+} -sensitiven ADP-Dissoziation und einer erhöhten Affinität des Akto-Myosin-Komplexes zu ADP. Die gegenteiligen Effekte wurden für die Mutanten von Myosin-1E und Myosin-5b beobachtet. Basierend auf den Struktur-Funktionsanalysen konnte die molekulare Grundlage des Mechanismus einer Mg^{2+} -sensitiven ADP-Dissoziation von Myosinen verschiedener Klassen definiert werden. Ferner zeigen die Resultate, dass Unterschiede in den molekularen Interaktionen zwischen Schalter-2 und benachbarten Strukturelementen, die sich aus der Anwesenheit bestimmter Aminosäuren in dieser Region ergeben, die *duty ratio* eines Myosins bestimmen.

Obwohl die prozessive Bewegung von Myosinen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist, sind die Voraussetzungen, die diese Bewegung ermöglichen, nicht bekannt. Um ein Minimalmodell eines prozessiven Myosins zu generieren, wurde in einem molekularen Protein-Konstruktionsansatz ein dimeres artifizielles Klasse-5 Myosin aus vier unabhängigen molekularen Bausteinen dargestellt, welches zu prozessiver Bewegung entlang von Aktin fähig ist. Die Ergebnisse der funktionalen Analyse dieses Motors bestätigen, dass die Länge der Nackendomäne die Schrittweite definiert und zeigen darüber hinaus, dass die Motordomäne allein prozessives Verhalten bestimmt: eine langsame geschwindigkeitsbestimmende und durch freie Mg^{2+} -Ionen regulierte ADP-Dissoziation sowie eine hohe Aktin-Affinität der schwach-Aktin-bindenden Zustände sind ausreichend, um ein dimerisiertes Myosin mit hoher *duty ratio* zu prozessiver Bewegung entlang eines Aktinfilaments zu befähigen. Darüber hinaus zeigen die Resultate, dass die assoziierten leichten Ketten in nativem Myosin-5 nicht notwendig sind für prozessives Verhalten und dass eine Kommunikation zwischen den beiden Motordomänen des dimeren Moleküls durch intramolekulare Spannungen stattfindet, welche durch die Nackenregionen vermittelt werden.

Eine ATPase-Zyklusdauer von weniger als 10 Millisekunden befähigt Klasse-11 Myosine in Pflanzen zu der schnellsten jemals für Myosine beobachteten Bewegung. Um zu verstehen wie diese Motoren solche Geschwindigkeiten erreichen können, wurde ein Motordomänenkonstrukt eines Klasse-11 Myosins aus *Nicotiana glauca* in *Dictyostelium* produziert und seine kinetischen Eigenschaften charakterisiert. Die Durchführung von Experimenten bei niedrigen Temperaturen ermöglichte die Analyse von anders nicht auflösbaren kinetischen Schritten des ATPase-Zyklus und dadurch die Beschreibung bis dahin unbekannter Eigenschaften dieser Motoren.

Schlüsselwörter: Myosin, Mg^{2+} -Ionen, *duty ratio*

SUMMARY

Processive myosins are characterized by a dimeric structure, extended neck-regions that transmit force and strain between the two heads, and an ATPase cycle that is dominated by states with a high affinity for actin (high duty ratio). These features enable processive myosins, e.g. myosin-5, to perform multiple coordinated steps along actin without dissociating. In contrast, non-processive myosins such as skeletal muscle myosin-2 and some monomeric class 1 myosins bind to the actin filament perform just one step and then dissociate rapidly. This short association with the actin filament is the result of a short fraction of time of the ATPase cycle these motors spend strongly attached to actin. Kinetic studies have shown that processive and non-processive myosins display pronounced differences in distinct steps of the ATPase cycle. However, it is still unclear how structural elements in the nucleotide and actin binding regions, mechanical properties of the head and neck regions, and kinetic parameters of the ATPase cycle are contributing to either a processive or non-processive mechanism of the motors. To identify the structural and functional requirements of processive movement and to explore the mechanisms of regulation of processivity, I followed a structure-based protein engineering approach in combination with molecular modelling studies of the nucleotide binding region of high and low duty ratio myosins and generated a set of myosin constructs that I have characterized kinetically and functionally.

On the basis of sequence alignments and structural considerations of the nucleotide binding pocket of class 1, 2, and 5 myosins, I have identified a non-conserved amino acid in switch-2, which is predicted to play a critical role in the mechanism of ADP release and mediating Mg^{2+} -coordination. Whereas high duty ratio myosins *Dd* myosin-1E and *Dd* myosin-5b have a tyrosine in the switch-2 consensus sequence (DIYGFE), the low duty ratio motors *Dd* myosin-1B and *Dd* myosin-2 have a phenylalanine and a serine, respectively. Motor domain constructs, in which the particular amino acid has been replaced by either a phenylalanine or a tyrosine were generated to elucidate the molecular mechanism that distinguishes high and low duty ratio motors. Since physiological changes in the concentration of free Mg^{2+} -ions can modulate the kinetic and motor properties of class-1 and class-5 myosins with a tyrosine in the switch-2 consensus sequence, but not those of class-1 and class-2 myosins with a substitution, I further addressed the question, whether switch-2 and in particular the tyrosine is responsible for this regulatory mechanism. The detailed kinetic characterization of the mutants by time resolved spectroscopy techniques revealed that the amino acid replacement leads to drastically altered nucleotide binding properties. In the case of myosin-1B, mutation led to Mg^{2+} -sensitive ADP-release kinetics and an increased ADP affinity in the actin-bound state. Exactly the opposite effects were observed for the myosin-1E and myosin-5b mutants. Based on the overall structure-function analyses, I could establish the molecular basis underlying the mechanism of Mg^{2+} -sensitive ADP-release in myosins of different classes. In addition, the results do further show that differences in the molecular interactions between switch-2 and neighbouring structural elements dictated by the presence of particular amino acids in this region, determine the duty ratio of a myosin.

Although the processive movement of myosins has been widely investigated, the requirements that enable this movement are not known. To generate a minimal model of a processive myosin, I followed a molecular engineering approach and designed a dimeric artificial class-5 myosin from four independent molecular building blocks that is capable of moving processively along actin. The results of the functional analysis of this motor prove the general view that the length of the neck determines the step size and in addition they clearly demonstrate that the motor domain is the sole determinant of processivity: a slow and rate limiting ADP-release controlled by the presence of free Mg^{2+} ions together with a high actin affinity in the weak actin binding states is sufficient to enable a dimerized high-duty ratio myosin to move processively along actin filaments. The results do further reveal that the associated light chains in native myosin-5 are not essential for the processive behaviour and that communication between the two heads has to occur in a strain-dependent mechanism via the interconnected neck regions of the dimeric molecule.

A total ATPase cycle time of less than 10 milliseconds enables class-11 myosins in plants to perform the fastest movement ever observed for members of the myosin family. To understand how these motors achieve such a fast movement, I expressed a motor domain construct of *Nicotiana tabacum* myosin-11 recombinantly in *Dictyostelium* cells and characterized its kinetic properties. Low temperature experiments were conducted to detect otherwise not resolvable kinetic steps of the ATPase cycle, thus enabling the description of not yet known features of these motors.

keywords: myosin, Mg^{2+} -ions, duty ratio

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
<i>A. castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
C-	Carboxy-
<i>C. corallina</i>	<i>Chara corallina</i>
<i>Cc</i>	<i>Chara corallina</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ca.	circa
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm)
CM-	Kardiomyopathie-
d	desoxy
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
G	Geneticin
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>Gg</i>	<i>Gallus gallus</i>
HC	<i>mouse mammary epithelial cell</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HL	<i>human promyelocytic leukemia</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HOAc	Essigsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
i.e.	<i>id est</i>
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
mant-	N-Methylantraniloyl-

MD	Motordomäne
β-ME	β-Mercaptoethanol
MES	2-[n-Morpholino]ethansulfonsäure
MFS-HT	<i>myosin-fusionstructure high throughput</i>
Mg	Magnesium
mhc	<i>myosin heavy chain</i> , Myosin schwere Kette
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
M _w	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N-	Amino-
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
Ni	Nickel
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NiNTA	Nickel-Nitriltriacetat
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
o-	ortho-
OAc	Acetat
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphat
PBS	phosphate buffer saline
PC	<i>pheochromocytoma</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Penicillin/Streptomycin
QM/MM	<i>Quantum mechanics/molecular mechanics</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
<i>Rn</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	<i>src homology region</i>
Tab.	Tabelle
TAME	N-Tosyl-L-Argininmethylesterhydrochlorid
TBST	Tris buffered saline Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-chloromethylketon
TLCK	N-Tosyl-N-Lysin-chloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>unit(s)</i> (Einheit)
u. a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt. Die Abkürzung der DNA-Basen entspricht den IUB *tentative rules*.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Molekulare Motoren	1
1.2	Die Superfamilie der Myosine	2
1.3	Die dreidimensionale Struktur der Myosinmotordomäne	5
1.4	Der ATPase-Zyklus von Myosinen	7
1.4.1	Bindung von ATP	8
1.4.2	<i>Recovery stroke</i> und ATP-Hydrolyse	8
1.4.3	Aktin-Reassoziation, Kraftschlag und Rückkehr in den <i>rigor</i> -Zustand	9
1.5	Kinetische Modelle der enzymatischen ATP-Umsetzung von Myosin	11
1.5.1	<i>Steady state</i> -ATPase-Aktivität von Myosin	11
1.5.2	Transientenkinetische Beschreibung der ATPase-Aktivität von Myosin	12
1.5.2.1	Interaktion von Myosin mit Nukleotid	12
1.5.2.2	Interaktion von Myosin mit F-Aktin	14
1.5.2.3	Interaktion von Myosin mit F-Aktin und Nukleotid	15
1.6	Mechanismen der Prozessivität	17
1.7	Regulation von Myosinen durch freie Mg^{2+}-Ionen	18
1.8	Molekulares <i>Engineering</i> von Myosin-Motoren	29
1.9	<i>Dictyostelium discoideum</i>	20
1.9.1	Lebenszyklus von <i>Dictyostelium</i>	20
1.9.2	<i>D. discoideum</i> als Expressionssystem für Myosine	21
1.9.3	<i>DdMyosin-1B</i>	22
1.9.4	<i>DdMyosin-1E</i>	22
1.9.5	<i>DdMyosin-2</i>	22
1.9.6	<i>DdMyosin-5b</i>	23
1.10	Zielsetzung der Arbeit	23

2.	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Geräte	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4	Medien und Nährböden für <i>E. coli</i>	29
2.1.5	Medien und Nährböden für <i>D. discoideum</i>	29
2.1.6	Organismen	30
2.1.7	Oligonukleotide	30
2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Klonierung von Plasmiden	31
2.2.1.1	Gewinnung von Vektor und Insert – Präparative Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.1.2	Ligation von Vektor und Insert	31
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNA	32
2.2.1.4	Restriktionsanalyse von klonierten Plasmiden – analytische Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.3	pGEM-TEasy-Klonierung und <i>Blue-White-Screening</i>	33
2.2.4	Synthese der verwendeten Expressionsvektoren	34
2.2.4.1	Expressionsvektoren zur Produktion von Myosinkonstrukten mit Mutationen in Schalter-2	34
2.2.4.2	Expressionsvektor zur Produktion des <i>in silico</i> entworfenen Myosins Myosin-5b-2R-LZ-EYFP	34
2.3	Mikrobiologische Methoden	35
2.3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	35
2.4	Zellbiologische Methoden	36
2.4.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	36
2.4.2	Transfektion von <i>D. discoideum</i>	36
2.4.3	Konservierung von <i>D. discoideum</i> in Form von Sporen	36
2.5	Proteinbiochemische Methoden	37
2.5.1	Analytische Präparation von rekombinanten Myosinkonstrukten aus <i>D. discoideum</i>	37
2.5.2	Präparative Aufreinigung von rekombinanten Myosinkonstrukten aus <i>D. discoideum</i>	37
2.5.3	Gewinnung von Aktin aus Kaninchenmuskel	41
2.5.3.1	Präparation von Aktin in Form von Aceton-Pulver	41
2.5.3.2	Präparation von F-Aktin aus Acetonpulver	41
2.5.4	Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin	42
2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.5.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gele	43
2.5.5.2	Western-Blot	44

2.5.6	Photometrische Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung	44
2.5.6.1	UV ₂₈₀ -Messung	44
2.5.6.2	Photometrische Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	44
2.6	Biophysikalische Methoden	45
2.6.1	<i>Steady state</i> -Kinetik	45
2.6.2	Transientenkinetik	46
2.6.2.1	<i>Stopped-flow</i> -Technik	46
2.6.2.2	<i>Flash-photolysis</i> -Technik	48
2.6.3	Analytische Ultrazentrifugation	49
2.6.3.1	Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation	49
2.6.3.2	Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Der molekulare Mechanismus der Schalter-2 vermittelten Regulation von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen durch freie Mg²⁺-Ionen	51
3.1.1	Kinetische Charakterisierung von <i>Dd</i> Myosin-1E-Y388F und <i>Dd</i> Myosin-5b-Y487F	52
3.1.1.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F	52
3.1.1.2	Transientenkinetische Charakterisierung von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F	53
3.1.1.2.1	Interaktion von Myosin und Akto-Myosin mit ATP	54
3.1.1.2.2	Interaktion von Myosin mit ADP	56
3.1.1.2.2.1	Auflösung von zwei Myosin-ADP-Zuständen	56
3.1.1.2.2.2	Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Myosin-ADP	57
3.1.1.2.3	Interaktion von Akto-Myosin mit ADP	59
3.1.1.2.3.1	Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP und ihre Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg ²⁺ -Ionen	59
3.1.1.2.3.2	Einfluss von ADP auf die ATP-induzierte Dissoziation von Akto-Myosin	60
3.1.1.2.4	Interaktion von Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin	61
3.1.2	Kinetische Charakterisierung von <i>Dd</i> Myosin-1B-F387Y und <i>Dd</i> Myosin-2-S456Y	63
3.1.2.1	Bestimmung der ATPase-Aktivität von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y	63
3.1.2.2	Transientenkinetische Analyse von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y	64
3.1.3	Erstellung eines strukturellen Modells der Nukleotidbindungstasche von Myosin-1E-Y388F	67
3.2	Darstellung eines künstlichen prozessiven Motors	69
3.2.1	Struktur-basierte <i>in silico</i> -Konstruktion und Darstellung von <i>Dd</i> Myosin-5b-2R-LZ-EYFP	69
3.2.2	Analytische Ultrazentrifugation und Nachweis prozessiver Bewegung von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP	71

3.3	Kinetische Charakterisierung eines Klasse-11 Myosins aus <i>Nicotiana tobacum</i>	73
3.3.1	Aufreinigung des rekombinanten Myosinkonstrukts <i>NtMyosin-11-2R</i>	73
3.3.2	Analyse der ATPase-Aktivität von <i>NtMyosin-11-2R</i>	73
3.3.3	Transientenkinetische Charakterisierung von <i>NtMyosin-11-2R</i>	75
3.3.3.1	Interaktion von <i>NtMyosin-11-2R</i> und Akto- <i>NtMyosin-11-2R</i> mit ATP	75
3.3.3.2	Interaktion von <i>NtMyosin-11-2R</i> und Akto- <i>NtMyosin-11-2R</i> mit ADP	78
3.3.3.3	Interaktion von <i>NtMyosin-11-2R</i> und <i>NtMyosin-11-2R</i> -ADP mit F-Aktin	81
4.	Diskussion	84
4.1	Aufklärung des molekularen Mechanismus einer Mg^{2+}-sensitiven ADP-Dissoziation von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen	84
4.1.1	Das Tyrosin in Schalter-2 von <i>DdMyosin-1E</i> und <i>DdMyosin-5b</i> ist für die hohe <i>duty ratio</i> der Motoren und ihre Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen notwendig	85
4.1.2	<i>DdMyosin-1B-F387Y</i> ist durch eine hohe Affinität zu ADP und eine Mg^{2+} -sensitive Produktdissoziation gekennzeichnet	87
4.1.3	<i>DdMyosin-2-S456Y</i> wird durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert	88
4.1.4	Ein Modell von <i>DdMyosin-1E-Y388F</i> beschreibt die strukturelle Grundlage einer hohen <i>duty ratio</i> und der Mg^{2+} -Sensitivität von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen	89
4.2	Darstellung und funktionale Charakterisierung eines künstlichen prozessiven Motors	90
4.3	Kinetische Analyse eines Klasse-11 Myosins aus <i>Nicotiana tobacum</i>	91
4.3.1	ATP und Trehalose erhöhen die Stabilität von isoliertem <i>NtMyosin-11-2R</i>	92
4.3.2	Die hohen Reaktionsgeschwindigkeiten von <i>NtMyosin-11-2R</i> ermöglichen die schnelle prozessive Bewegung des Klasse-11 Myosins	92
5.	Literaturverzeichnis	96
6.	Publikationen und Präsentationen	108
	Lebenslauf	

KAPITEL I

EINLEITUNG

1.1 Molekulare Motoren

Eines der wesentlichen Merkmale lebender Organismen ist die Fähigkeit zu aktiver Bewegung. Viele Bewegungsvorgänge werden auf zellulärer Ebene durch sogenannte molekulare Motoren generiert. Dabei handelt es sich um Proteine, die chemische in mechanische Energie in Form von Kraft und gerichteter Bewegung umwandeln können. Zu den Motorproteinen zählt neben Kinesinen und Dyneinen die Familie der Myosine. Ihre Mitglieder interagieren unter Umsetzung des chemischen Energieäquivalents Adenosin-5'-triphosphat (ATP) mit filamentösem Aktin (F-Aktin), einem Bestandteil des Zytoskeletts, und sind in verschiedene zelluläre Prozesse involviert wie Vesikeltransport (TUXWORTH et al., 2000), Zytokinese (GRÄF et al., 2004), Zellpolarität (BÄHLER, 2000), Morphogenese (NOVAK et al., 1995), Chemotaxis (OSTAP et al., 1996), Signaltransduktion (YIN et al., 2000) oder Muskelkontraktion (SELLERS, 2000).

Der Mensch verfügt über 39 Myosingene aus 12 verschiedenen Klassen. Mutationen in diesen Genen können zu schweren organischen und mechanosensorischen Defekten führen. So wird die *familiäre hypertrophe Kardiomyopathie* durch Punktmutationen der β -kardialen Isoform von Myosin-2 und seiner leichten Ketten bedingt. Die daraus resultierende asymmetrische Verdickung des linken Herzventrikels kann zu plötzlichem Herztod führen (BONNE et al., 1998). Die autosomal rezessiv vererbte Krankheit *Usher 1*, die durch angeborene Taubheit und ein allmähliches Absterben der Photorezeptoren im Auge gekennzeichnet ist, wird durch Mutationen in einem Gen für Myosin-7A hervorgerufen (BOEDA et al., 2002). Defekte in den Genen für nichtmuskuläres Myosin-2A und Myosin-2B können schließlich zur Entstehung und Progression von Tumoren beitragen (BETAPUDI et al., 2006). Die Vielzahl der auf Myosin-Defekten basierenden Krankheiten macht diese Motorproteine zu einem Forschungsgebiet auch im Bereich der Medizin. Um neue Therapieansätze entwickeln zu können, ist das Wissen um die genauen molekularen Mechanismen, die Myosine zu ihren vielfältigen Aufgaben befähigen, unerlässlich.

Einen besonderen Schwerpunkt in der Myosinforschung stellt die Aufklärung der enzymatischen Konvertierung der in Form von ATP gespeicherten Energie in gerichtete Bewegung dar. Bis heute ist der genaue Ablauf dieser mechanochemischen Reaktion, die sich als eine zyklische Abfolge von Einzelreaktionen beschreiben lässt, nicht genau verstanden. Auch die vielfältigen Möglichkeiten zur Regulation der ATP-Umsetzung durch Beeinflussung der kinetischen Parameter des ATPase-Zyklus sind Gegenstand zahlreicher Studien. Zu den in den letzten Jahren und Jahrzehnten etablierten

Methoden zur Untersuchung dieser Mechanismen zählen neben kinetischen Verfahren Methoden zur Analyse der molekularen Motoren auf Einzelmolekülebene. Diese Techniken, zu denen optische Laserfallen, Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen und verschiedene Arten hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie zählen, ermöglichen u. a. eine direkte Messung der Kraftentwicklung und Bewegung einzelner Myosine (YANAGIDA et al., 2008)

1.2 Die Superfamilie der Myosine

Myosine bilden eine große Familie von eukaryotischen Motorproteinen, die unter ATP-Spaltung mit F-Aktin interagieren und dadurch mechanische Kraft und Bewegung generieren. Im Allgemeinen setzen sich Myosinmoleküle aus schweren und leichten Ketten zusammen (SELLERS, 2000). Die schwere Kette ist durch drei Subdomänen charakterisiert. Eine N-terminale, hochkonservierte Motordomäne ist für die ATP-Umsetzung und die Wechselwirkung mit F-Aktin verantwortlich. Auf diese folgt eine α -helikale Nackendomäne, die ein oder mehrere sogenannte IQ-Motive aufweisen kann, an die die leichten Ketten (Calmodulin oder andere Mitglieder der EF-Hand-Proteinfamilie) binden (KOLLMAR, 2006). Durch extensive Sequenzvergleiche konnte die Konsensussequenz des IQ-Motivs zu (I/X)QXX(Y/F/W)RX(Y/F/W)XX(R/X) definiert werden. Die leichten Ketten dienen der Stabilisierung der Nackendomäne, sodass diese eine stabförmige Struktur ausbilden kann. Die aus der ATP-Umsetzung freigewordene Energie wird in eine hebelarmartige Bewegung der Nackenregion, den sogenannten Kraftschlag (*power stroke*) umgesetzt. Dieser Mechanismus bildet die Grundlage der Hypothese des schwingenden Hebelarms (*swinging-lever-arm* Hypothese), welche die Nackendomäne als steifen Hebel beschreibt, der kleine Konformationsänderungen in der ATP-Bindungstasche verstärkt und so die Bewegung von Myosin entlang von Aktin bewirkt (HOLMES, 1997). Neben der stabilisierenden Funktion sind leichte Ketten auch an der Regulation der ATPase-Aktivität beteiligt (WARRICK und Spudich, 1987). An die Nackendomäne schließt eine C-terminale Schwanzdomäne an. Sie kann z. B. superspiralisierte (*coiled-coil*)- α -Helices zur Dimerisierung des Myosins enthalten. Auch konservierte funktionale Motive, die für Vesikel-Bindung, Protein-Protein-Interaktionen oder weitere Funktionen wie Kinaseaktivität oder Lipidbindung verantwortlich sind, können Bestandteil der Schwanzdomäne sein (KOMABA et al., 2003; TYSKA und Mooseker, 2004). Die zelluläre Lokalisation eines Myosins und seine Funktion werden daher maßgeblich durch Strukturelemente in der Schwanzdomäne bestimmt (KRENDEL und Mooseker, 2005).

Eine Klassifizierung der Myosin-Superfamilie erfolgt in der Regel durch Sequenzvergleiche der konservierten Motordomäne. FOTH et al. (2006) unterscheiden 24 verschiedene Myosinklassen, die in weitere Unterklassen unterteilt sind. Die Verwandtschaft der einzelnen Klassen kann anhand eines phylogenetischen Stammbaums dargestellt werden (s. Abb. 1).

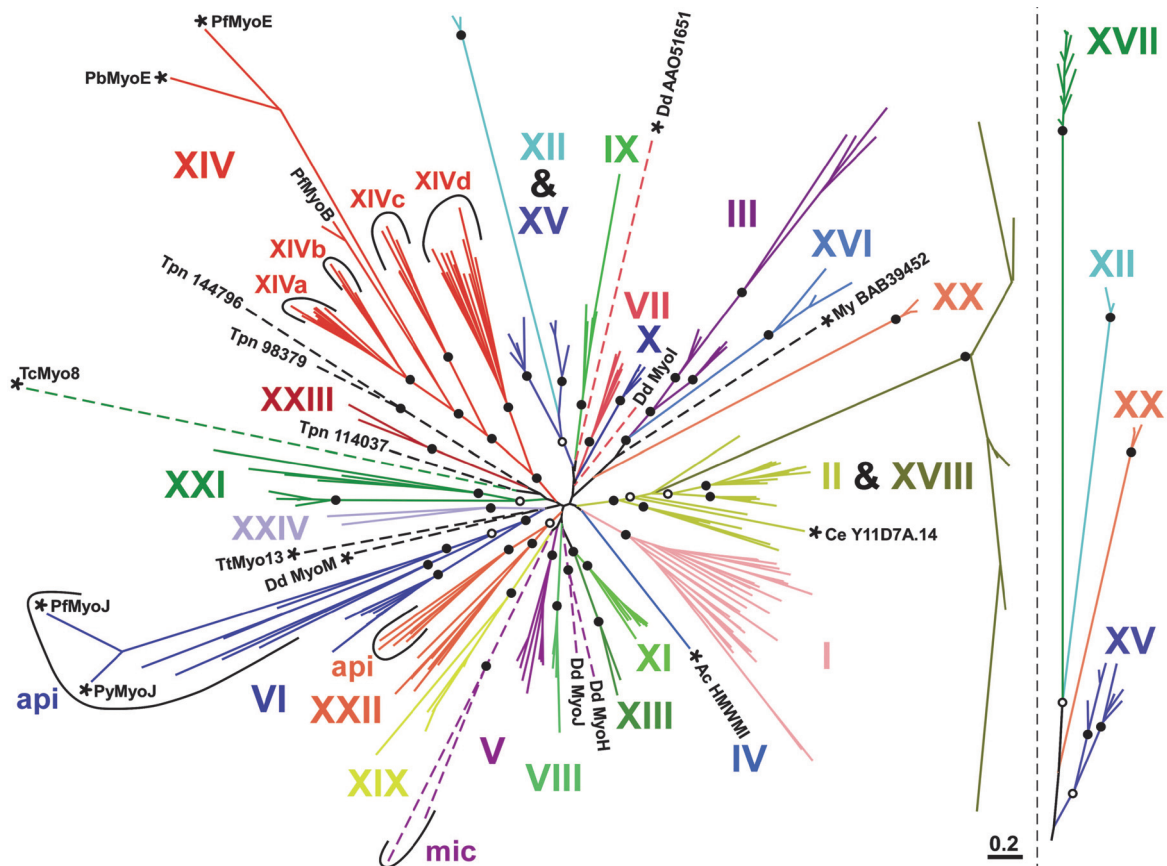


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Myosin-Superfamilie, basierend auf der Sequenzanalyse der Motordomänen von 267 Myosinen aus 24 Klassen (verändert nach FOTH et al., 2006).

Das erste, bereits im 19. Jahrhundert entdeckte und am umfangreichsten untersuchte Myosin ist doppelköpfiges Skelettmuskelmyosin (KÜNE, 1864). Es bildet zusammen mit weiteren Muskelmyosinen und einigen nicht-muskulären Myosinen eine Klasse, die aufgrund der dimeren Struktur der Mitglieder als Klasse-2 bezeichnet wird. Die Dimerisierung basiert auf der Ausbildung einer stabförmigen *coiled-coil*-Region durch die Schwanzdomäne. Unter physiologischen Bedingungen formen die dimeren Schwanzdomänen bipolare Filamente, die der Erzeugung kontraktile Kräfte durch Akto-Myosin-Interaktion dienen. Neben der Muskelkontraktion spielen Myosine der Klasse-2 bei zahlreichen zellulären Prozessen wie der Zellteilung, Zellmigration und Zelladhäsion eine entscheidende Rolle (SELLERS, 2000).

1973 isolierten POLLARD und Korn ein Myosin aus *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*). Im Gegensatz zu Myosin-2 liegt dieses als Monomer vor und begründete daher die Myosinklasse 1. Diese und alle später entdeckten Myosinklassen werden als unkonventionelle Myosine bezeichnet, während Myosin-2 auch konventionelles Myosin genannt wird. Klasse-1 Myosine zeigen die weiteste taxonomische Verteilung und werden von ODRONITZ und Kollmar (2007) als Urmyosine beschrieben. Ihr struktureller Aufbau folgt der oben dargestellten Zusammensetzung, jedoch unterscheiden sie sich in der Anzahl der leichten Ketten sowie der hohen Diversität der C-terminalen Schwanzdomäne. Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*; *Dd*) exprimiert sieben verschiedene Klasse-1-Myosine: *Dd*Myosin-1A bis -1G (KOLLMAR et al., 2006). Anhand der Schwanzdomäne ist eine weitere Einteilung in solche mit kurzer (*Dd*Myosin-1A, -1E und -1F), langer (*Dd*Myosin-1B, -1C und -1D) bzw. keiner Schwanzdomäne (*Dd*Myosin-1G) möglich (BERG et al., 2001). Kurze

Schwanzdomänen bestehen nur aus einer, an basischen Aminosäuren reichen, Domäne (*tail homology* 1-, TH1-Domäne), die zur Interaktion mit anionischen Phospholipiden dient und so an Membranen binden kann (TITUS et al., 1993). Lange Schwanzdomänen besitzen neben der TH1-Domäne eine sogenannte GPA/Q-Domäne (TH2), die bevorzugt die Aminosäuren Glycin, Prolin und Alanin bzw. Glutamin enthält und nukleotidunabhängig mit Aktin interagieren kann, sowie eine SH3- (*src homology* 3-)Domäne (TH3) für weitere Protein-Protein-Interaktionen wie z. B. die Bindung von Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes, einem wichtigen Regulator der Aktin-Polymerisation (LEE et al., 2000; LECHLER et al., 2000). Klasse-1 Myosine sind in zahlreiche zelluläre Prozesse wie Zellmotilität, Pino-, Phago-, und Exozytose, Zell-Zell-Kontakt, Signaltransduktion sowie Aufrechterhaltung und Regulation kortikaler Spannung involviert (FALK et al., 2003; MERMALL et al., 1998). Eine reversible Aktivierung der Motoraktivität von Klasse-1 Myosinen aus *D. discoideum* sowie *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *A. castellanii* erfolgt durch Phosphorylierung der sogenannten TEDS-Stelle in der Kardiomyopathie- (CM-)Schleife der Motordomäne (BEMENT und Mooseker, 1995). Die durch Phosphorylierung eingeführte zusätzliche negative Ladung verstärkt die Interaktion dieser Region mit F-Aktin und damit auch den Einfluss von Aktin auf die ATPase-Aktivität des Myosins. Weiterhin ist für *DdMyosin*-1D und -1E die Regulation ihrer kinetischen Eigenschaften und in Folge der Motoraktivität durch freie Mg^{2+} -Ionen bekannt (s. Kapitel 1.7; FUJITA-BECKER et al., 2005; DÜRRWANG et al., 2006). Während somit die TEDS-Stellen-Phosphorylierung als genereller An/Aus-Schalter betrachtet werden kann (NOVAK und Titus, 1998), ist die regulatorische Wirkung freier Mg^{2+} -Ionen auf die ATPase-Aktivität vermutlich mit der Änderung der zellulären Funktion dieser Myosine verbunden.

Neben Myosin-1 und Myosin-2 zählen Mitglieder der Klasse-5 zu den am besten charakterisierten Myosinen. Sie bestehen aus einer Motordomäne, einer Nackenregion mit fünf bis sechs IQ-Motiven zur Bindung von leichten Ketten, einer *coiled-coil*-Region zur Dimerisierung des Moleküls sowie einer globulären Schwanzregion. Diese dient neben der der Bindung von Zellorganellen (LI und Nebenführ, 2008) auch der Inaktivierung der Motoraktivität durch Rückfaltung und Bindung an die Motordomäne (THIRUMURUGAN et al., 2006). Eine besondere Eigenschaft vieler näher untersuchter Klasse-5 Myosine aus Vertebraten wie *Gallus gallus* (*Gg*) Myosin-5a und *Mus musculus* (*Mm*) Myosin-5 ist eine hohes Verhältnis (*duty ratio*) der Zeitdauer, die das Myosin im stark Aktin-gebundenen Zustand verbringt, zur Gesamtdauer des ATPase-Zyklus (DE LA CRUZ et al., 1999; WANG et al., 2000). Diese Fähigkeit ermöglicht es dimeren Myosinmolekülen, sich in einem schrittartigen Mechanismus (*hand-over-hand* Mechanismus), bei dem ein Myosinkopf vor den anderen gesetzt wird, entlang einem Aktin-Filament zu bewegen (MEHTA et al., 1999). Aufgrund dieser sogenannten prozessiven Bewegung kann auch ein einzelnes Myosinmolekül ein Vesikel effektiv transportieren.

Mit Klasse-5 Myosinen phylogenetisch und strukturell eng verwandt sind pflanzliche Myosine der Klasse-11. Besonderes Interesse galt in den vergangenen Jahren vor allem dem Klasse-11 Myosin der Alge *Chara corallina* (*CcMyosin*-11), welches für die Entstehung der zytoplasmatischen Strömung in den bis zu 20 cm langen internodalen Zellen verantwortlich ist (HIGASHI-FUJIME, 1980). Dort sind Chloroplasten im stationären Ektoplasma verankert. Auf der zytoplasmatischen Seite der Zellorganellen sind Aktinfilamentbündel parallel angeordnet (KAMITSUBO, 1966; NAGAI und Rebhun, 1966). Entlang dieser Filamente transportieren Myosinmoleküle Organellen wie Dictyosomen und Mitochondrien oder

Vesikel. Aufgrund der hohen Viskosität des Endoplasmas bewirkt diese Vesikelbewegung eine Strömung, welche in Algen Geschwindigkeiten bis zu 100 $\mu\text{m/s}$ erreichen kann (STAVES et al., 1995) und damit die schnellste bekannte Bewegung von Myosinen darstellt. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob Myosine der Klasse 11 durch prozessives Verhalten gekennzeichnet sind. Während Studien an MYA1 aus *Arabidopsis thaliana* (HACHIKUBO et al., 2007) und einem Klasse-11 Myosin aus *Nicotiana tabacum* (TOMINAGA et al., 2003) auf einen Mechanismus prozessiver Bewegung, vergleichbar Myosin-5, hinweisen, widersprechen sich im Falle von CcMyosin-11 die durchgeführten funktionalen und kinetischen Untersuchungen. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in den Daten zu der maximalen Aktin-aktivierten ATP-Umsatzgeschwindigkeit, der Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem Komplex mit Akto-Myosin sowie der *duty ratio* als wesentliches Kriterium für prozessives Verhalten (HIGASHI-FUJIME, 2003; AWATA et al., 2003; ITO et al., 2007)

1.3 Die dreidimensionale Struktur der Myosinmotordomäne

Trotz der vielfältigen Aufgaben, die Myosine verschiedener Klassen in der Zelle übernehmen, weisen die dreidimensionalen Strukturen der Motordomänen eine hohe Konserviertheit auf (BERG et al., 2001). Abweichungen in der Aminosäuresequenz und daraus resultierende strukturelle Veränderungen stellen eine Anpassung an die spezifische Funktion des jeweiligen Myosins dar. Mithilfe der Röntgenkristallographie und der Verwendung verschiedener Nukleotidanaloga gelang es, die Kristallstrukturen der Motordomänen von Myosinen der Klassen 1 (KOLLMAR et al., 2002), 2 (z. B. RAYMENT et al., 1993; FISHER et al., 1995), 5 (COUREUX et al., 2003, 2004) und 6 (z. B. MÉNÉTREY et al., 2005, 2008) in verschiedenen Konformationen, die während der ATP-Umsetzung eingenommen werden, aufzuklären.

Abbildung 2 zeigt die dreidimensionale Struktur der Motordomäne von DdMyosin-1E im Komplex mit ADP·VO₄ (KOLLMAR et al., 2002). Die N-terminale 25 kDa-Domäne formt gemeinsam mit der sich anschließenden oberen 50 kDa-Domäne sechs der sieben β -Faltblätter der Myosinkernstruktur. Verbunden sind die beiden Domänen durch Schleife-1. Auf die obere 50 kDa-Domäne folgt, verknüpft durch Schleife-2, die untere 50 kDa-Domäne. Diese beiden Domänen bilden die Aktinbindungsspalte, die sich bei der Bildung des Akto-Myosin-Komplexes schließt (VOLKMANN et al., 2000). Wesentliche Aufgaben bei der Aktinbindung übernehmen die CM-Schleife, die positiv geladene Schleife-2, sowie das sogenannte Helix-Schleife-Helix-Motiv. Auch die Beteiligung von Schleife-4 an der Interaktion mit Aktin wird diskutiert (HOLMES et al., 2004). Während die genannten Regionen an ein Aktinmonomer des Aktinfilaments binden, wird für Myosin-5 und andere Myosine angenommen, dass auch eine schwache Wechselwirkung zwischen Schleife-3 des Myosins und dem folgenden Aktinmonomer besteht (VAN DIJK et al., 1999). An die untere 50 kDa-Domäne schließt die 20 kDa-Domäne, der sogenannte Konverter (HOUDUSSE und Cohen, 1996) an, der vom C-Terminus der Myosinmotordomäne gebildet wird.

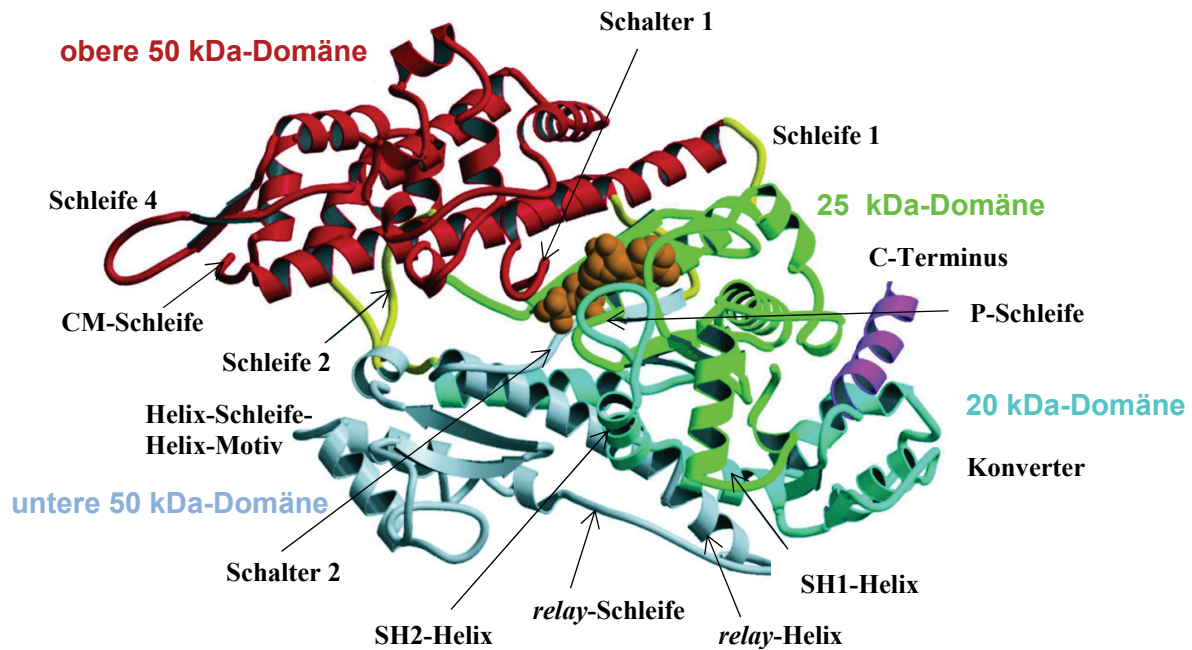


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur der Motordomäne von *DdMyosin-1E*, mit $\text{ADP} \cdot \text{VO}_4$ komplexiert (verändert nach KOLLMAR et al., 2002)

Die Nukleotidbindungstasche des Myosins besteht aus drei hochkonservierten Bereichen: der Phosphat-Bindungsschleife (P-Schleife, 25 kDa-Domäne) sowie den beiden sogenannten Schaltern-1 und -2 (obere bzw. untere 50 kDa-Domäne) (COPE et al., 1996). Diese interagieren sowohl mit dem Nukleotid als auch untereinander und sind so für den Nukleotidumsatz verantwortlich. Kleine Konformationsänderungen in der Nukleotidbindungstasche, die mit der ATP-Umsetzung verbunden sind, werden u. a. durch die *relay*-Helix in der unteren 50 kDa-Domäne auf den Konverter übertragen. Dieser reagiert mit umfangreichen strukturellen Änderungen, die in dem Kraftschlag der Nackenregion resultieren.

Sowohl Vergleiche der Aminosäuresequenz als auch der atomaren Struktur von Myosin mit Kinesin als weiterem ATP-hydrolysierenden Motorprotein (KULL et al., 1996; KOZIELSKI et al., 1997; SACK et al., 1997) zeigen einen ähnlichen Aufbau der Nukleotidbindungstaschen beider Proteine (VALE, 1996). VALE (1996) stellt außerdem die Analogie der nukleotidinteragierenden Strukturen zu den GTP-hydrolysierenden G-Proteinen fest, welche als molekulare Schalter in der zellulären Signaltransduktion fungieren. Auch wenn sich die Mechanismen des ATPase-Zyklus von Myosin und Kinesin und der damit verbundenen Interaktion mit Aktin bzw. Tubulin unterscheiden, lassen die Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, der Struktur der Nukleotidbindungstasche und der Nukleotid-Hydrolyse auf ein gemeinsames Vorläuferprotein von G-Proteinen und Motorproteinen schließen (KULL und Endow, 2002). Tabelle 1 zeigt die Aminosäuresequenzen der Strukturelemente aus G-Proteinen, Kinesinen und Myosinen, die die Nukleotidbindungstasche formen. Einzelne Aminosäuren in den hochkonservierten Regionen weichen zwischen den Mitgliedern einer Motorproteinfamilie ab.

Tab. 1: Sequenzvergleich der Nukleotidbindungstaschenbestandteile P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 zwischen G-Proteinen, Kinesinen und Myosinen

	P-Schleife	Schalter-1	Schalter-2
G-Proteine	GxxGxGKS/T	T	DxxG
Kinesine	GQTxxGKS/T	NxxSSR	DLAGSE
Myosine	GESxxGKS/T	NxxS(S/T)R	DIxGFE

1.4 Der ATPase-Zyklus von Myosinen

Die enzymatische Umsetzung von ATP, welche die vielfältigen zellulären Funktionen von Myosinen ermöglicht, ist bis heute aufgrund ihrer Komplexität nicht vollständig verstanden. Das gegenwärtige Bild des ATPase-Zyklus basiert zum einen auf den Kristallstrukturen von Myosinen in verschiedenen Zwischenzuständen des Zyklus und darauf aufbauenden Modellen (z. B. RAYMENT et al., 1993; FISHER et al., 1995; DOMINGUEZ et al., 1998; KOLLMAR et al., 2002; HOUDUSSE et al., 2003; REUBOLD et al., 2003; HOUDUSSE et al., 2004; FISCHER et al., 2005; KOPPOLE et al., 2007), zum anderen auf mechanistischen, funktionalen und kinetischen Untersuchungen von nativen Myosinen, Motordomänenkonstrukten und Myosin-Mutanten. Einen Überblick über Studien dieser Art an Myosin-2 geben z. B. GEEVES und Holmes (1999). Abbildung 3 stellt ein schematisches Modell des ATPase-Zyklus von Akto-Myosin dar (GEEVES et al., 2005).

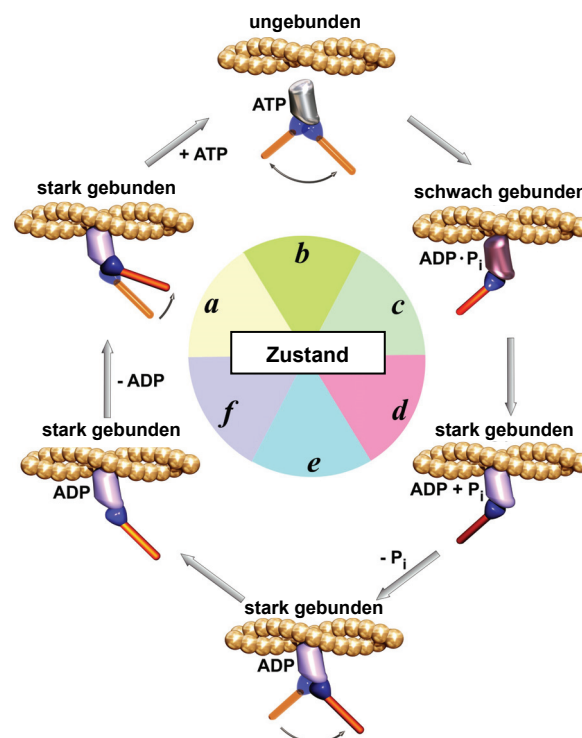


Abb. 3: Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von Akto-Myosin (verändert nach GEEVES et al., 2005). Im *rigor*-Komplex (a) ist Myosin (violett: Myosinkernstruktur; blau: Konverter; orange: Hebelarm) stark an Aktin (gelb) gebunden. Mit der Bindung von ATP an Myosin dissoziiert der Komplex. Der Hydrolyse des Nukleotids geht eine Bewegung des Hebelarms, der sogenannte *recovery stroke*, voraus (b). Als ADP·P_i-Komplex bindet Myosin in einem zweistufigen Prozess erst schwach, dann stark an Aktin (c, d). Dies führt zur Phosphat-Dissoziation und, damit verbunden, zum Kraftschlag des Hebelarms (e). Eine weitere Bewegung des Hebelarms von ~ 5 nm, verbunden mit der ADP-Dissoziation (f, a), wurde für verschiedene spannungssensitive Myosine wie *MmMyosin-5* (VEIGEL et al., 2002) oder *GgMyosin-1a* (VEIGEL et al., 1999) beobachtet. Mit der Abgabe von ADP geht Akto-Myosin wieder in den *rigor*-Zustand (a) über.

Die folgende strukturelle Betrachtung des ATPase-Zyklus beruht, den heutigen Erkenntnissen entsprechend, in erster Linie auf konventionellem Myosin-2, alle Angaben zu Aminosäuren beziehen sich auf die Motordomäne von Myosin-2 aus *D. discoideum*. Auf Abweichungen im Fall von Myosin-5, das in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher struktureller Untersuchungen war, wird in den entsprechenden Fällen hingewiesen.

1.4.1 Bindung von ATP

Myosin ist im *rigor*-Zustand stark an F-Aktin gebunden, Schalter-1 (Aminosäuren (AS) 233 - 238) und Schalter-2 (AS 454 - 459), die zusammen mit der P-Schleife (AS 179 - 186) die Nukleotidbindungstasche formen, liegen im sogenannten offenen Zustand vor. Zwischen den beiden Schaltern besteht eine Salzbrücke, gebildet von den Aminosäuren R238 und E459 (REUBOLD et al., 2003). Die *relay*-Helix, die Schalter-2 über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der C-terminalen Konverter-Region (AS 692 - 748) und so mit dem Hebelarm verknüpft, ist in einem geraden Zustand (RAYMENT et al., 1993). Mit der Bindung von Mg^{2+} -ATP bewegt sich die P-Schleife in Richtung Nukleotid. Auch Schalter-1 ändert seine Ausrichtung und beginnt sich zu schließen, wodurch es zum Bruch der Salzbrücke R238/E459 kommt (REUBOLD et al., 2003). Das Mg^{2+} -Ion liegt in 6-fach koordiniertem Zustand vor. Zwei Koordinationsbindungen werden durch P_β und P_γ des ATP-Moleküls ausgebildet, weitere drei Bindungen entstehen mit T186 (P-Schleife), S236 (Schalter-1) sowie einem Wasser-Molekül (W_4 , siehe Abb. 4). Die sechste Bindung wird durch ein weiteres Wassermolekül (W_3) ausgebildet, das durch D454 und I455 (Schalter-2) koordiniert wird. Im nun bestehenden *post-rigor*-Zustand existieren zahlreiche Bindungen zwischen ATP und P-Schleife sowie Schalter-1, der in geschlossenem Zustand vorliegt (FISHER et al., 1995). Mit der strukturellen Änderung von Schalter-1 geht die Öffnung der Aktinbindungsspalte einher. Dies führt zu einer Abnahme der Affinität des Myosins zu Aktin und schließlich zur schnellen Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes (CONIBEAR et al., 2003; GOODY, 2003).

1.4.2 Recovery stroke und ATP-Hydrolyse

Mit dem schrittweisen Schließen von Schalter-2 (s. Abb. 4; ONISHI et al., 2004) geht die vollständige Koordination von Mg^{2+} -ATP einher. Es kommt zur erneuten Bildung der Salzbrücke zwischen E459 und R238 (FURCH et al., 1999; REUBOLD et al., 2003). Durch E459 und G457 kann nun das für die ATP-Hydrolyse notwendige Wasser-Molekül W_2 gebunden und in die richtige Ausrichtung gebracht werden, sodass dieses ein weiteres Wasser-Molekül (W_1) koordinieren kann. In diesem hydrolysekompetenten Zustand agiert W_1 als Nukleophil und P_γ wird in einer bimolekularen nukleophilen Substitution von ATP abgespalten. In gleichzeitig ablaufenden Teilreaktionen wird von W_1 ein Proton auf W_2 und das verbleibende OH^- -Ion auf P_γ übertragen (ONISHI et al., 2004). Dabei erfährt P_γ eine sogenannte Walden'sche Umkehr: es geht aus der Tetraeder-Struktur über die trigonal-bipyramidale Konformation eines pentakovalenten Zustands in eine Tetraeder-Struktur mit invertierter Konformation über. Auf die Beteiligung zweier Wasser-Moleküle an der Hydrolyse-Reaktion und die Existenz eines einzigen Übergangszustands lassen auch sogenannte *Quantum mechanics/Molecular mechanics*- (QM/MM-)Berechnungen schließen, die quantenmechanische und klassische molekülmechanische Simulationsmethoden kombinieren (GRIGORENKO et al., 2007).

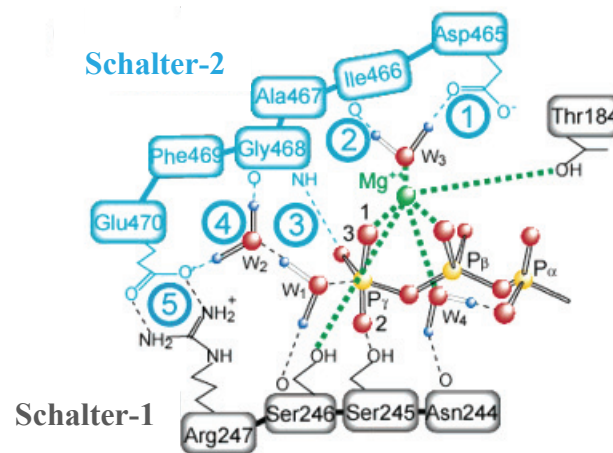


Abb. 4: Modell des Schließvorgangs von Schalter-2 zur Ausbildung des hydrolysekompetenten Zustands in fünf Schritten (verändert nach ONISHI et al., 2004). Zu sehen ist der pentakovalente Übergangszustand von P_γ . Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht Myosin-2 aus glattem Muskel von *G. gallus*. Die zu Thr184, Asn244, Ser245, Ser246, Arg247, Asp465, Ile466, Ala467, Gly468, Phe469 und Glu470 korrespondierenden Aminosäuren in *DdMyosin-2* sind Thr186, Asn235, Ser236, Ser237, Arg238, Asp454, Ile455, Ser456, Gly457, Phe458 und Glu459.

Die Schalter-2 Region ist durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit der *relay*-Helix und in Folge mit dem Konverter verbunden (FISHER et al., 1995). Durch diese dreidimensionale Verknüpfung der einzelnen Domänen führt das Schließen von Schalter-2 und seine damit einhergehende Verlagerung um 6 Å zu einer Rotation des Konverters um 65° (KOPPOLE et al., 2006). Die *relay*-Helix erfährt dabei eine partielle Entwindung sowie einen Knick. Der an den Konverter anschließende Hebelarm vollzieht den *recovery stroke*.

Die oben beschriebene Hydrolyse-Reaktion ist nur durch Schließen von Schalter-2 und der Ausbildung der Salzbrücke R238/E459 möglich. Myosin-Mutanten, bei denen die Formation der Salzbrücke gestört ist, sind nicht zur ATP-Hydrolyse fähig (ONISHI et al., 1997; SASAKI et al., 1998; FURCH et al., 1999). Die Verknüpfung des *recovery stroke* mit der für die Hydrolysereaktion notwendigen Schalter-2 Bewegung verhindert die Verschwendung der Energie des ATP, während der Hebelarm noch die Konformation nach dem Kraftschlag einnimmt (MALNASI-CZISMADIA et al., 2000; URBANKE und Wray, 2001).

ONISHI et al. (2004) beschreiben W_2 als finalen Proton-Akzeptor der Hydrolyse-Reaktion. QM/MM-Berechnungen durch GRIGORENKO et al. (2007) deuten jedoch darauf hin, dass das Proton von W_2 weiter auf E459 übertragen wird, was zu der Destabilisierung der Salzbrücke und so zu der im folgenden beschriebenen Fortsetzung des ATPase-Zyklus beitragen würde.

1.4.3 Aktin-Reassoziaton, Kraftschlag und Rückkehr in den *rigor*-Zustand

Nach der ATP-Hydrolyse hat Myosin Mg^{2+} -ADP· P_i gebunden und liegt im sogenannten *pre-power-stroke*-Zustand vor. In dieser Konformation ist die Dissoziation der Hydrolyse-Produkte erschwert, bis durch die erneute Bindung an Aktin weitere strukturelle Änderungen eingeleitet werden. Diese beginnen mit dem ersten Schließen der Aktinbindungsspalte und einer Entfernung der P-Schleife vom Nukleotid um 5 Å. Dadurch werden die drei Koordinationsbindungen zwischen P-Schleife und P_γ gebrochen. Die Konformationsänderung der Aktinbindungsspalte führt im Weiteren zu einer ersten Öffnung von Schalter-1 (HOLMES und Schröder, 2003; COUREUX et al., 2003), die Bindung zwischen Mg^{2+} und S236 wird geschwächt (YU et al., 2007). Schließlich kommt es zu der, durch Aktin um einen

Faktor > 100 beschleunigten, Dissoziation des P_i -Restes (SIEMANKOWSKY und White, 1984; WHITE et al., 1997). Damit gehen der Kraftschlag des Hebelarms, die verstärkte Bindung an Aktin sowie die weitere Öffnung von Schalter-1 einher, was in dem Bruch der Salzbrücke zwischen Schalter-1 und Schalter-2 resultiert (KOPPOLE et al., 2006). Die beiden Koordinationsbindungen, die zwischen Mg^{2+} und P_i bestanden haben, werden nun durch zwei weitere Wassermoleküle und Mg^{2+} ausgebildet (GULICK et al., 1997). In Myosin-2 folgt die Öffnung von Schalter-2 (RAYMENT et al., 1993; ZENG et al., 2004; STEFFEN und Sleep, 2004) und die weitere Destabilisierung der Mg^{2+} -Koordination. Auch ADP ist durch die Konformationsänderungen von P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 nur noch lose in der Nukleotidbindungstasche verankert. Die vollständige Öffnung von Schalter-2 führt zur Dissoziation von Mg^{2+} -ADP und damit zur Rückkehr von Myosin in den stark Aktin-bindenden, nukleotidfreien *rigor*-Zustand (HIMMEL et al., 2002; KINTSES et al., 2007).

Im Fall von Myosin-5 konnten ROSENFELD et al. (2005) durch kinetische Studien zeigen, dass die Dissoziation von Mg^{2+} der Dissoziation von ADP vorausgeht. Die Abgabe des Mg^{2+} -Ions destabilisiert die Mg^{2+} -bindenden Strukturelemente P-Schleife, Schalter-1 und -2 und bewirkt so den Übergang eines stark- in einen schwach-ADP-bindenden Akto-Myosin-ADP-Komplex (s. Abb. 5). Die Autoren vermuten, dass diese, durch die Abgabe des Mg^{2+} -Ions hervorgerufene, Konformationsänderung mit der für Myosin-5 postulierten zweiten Phase des Kraftschlags einhergeht.

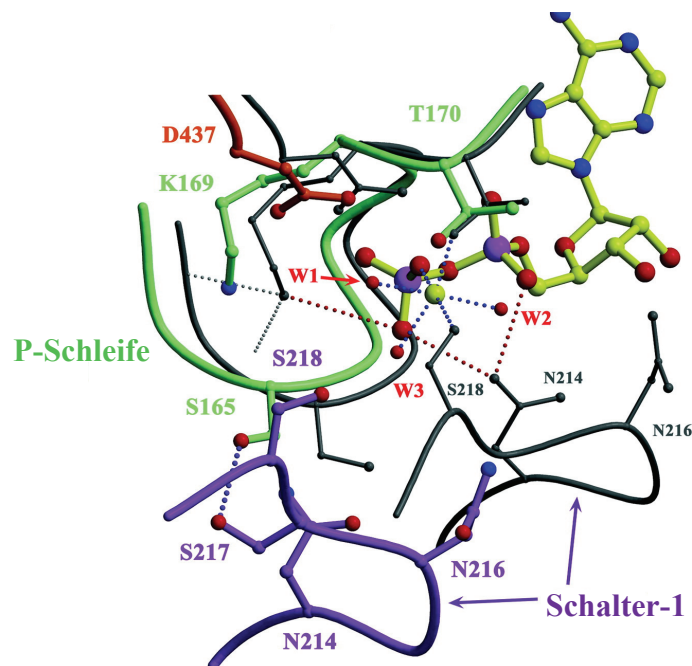


Abb. 5: Vergleich der Konformation der Nukleotidbindungstasche von GgMyosin-5a in der schwach-ADP-bindenden Struktur (bunt) und der *post-rigor*-Konformation (grau) (verändert nach ROSENFELD et al., 2005). Wichtige Koordinationsbindungen zwischen Wassermolekülen (rot), P-Schleife (grün) und Schalter-1 (lila) zum Nukleotid (rote Punkte) und Mg^{2+} (gelb; blaue Punkte) sind in der schwach-ADP-bindenden Struktur nicht mehr ausgebildet. Dies führt zu der Dissoziation des Mg^{2+} -Ions. Die Aminosäuren S165, K169, T170, N214, N216, S217, S218 und D437 entsprechen DdMyosin-2 S181, K185, T186, N233, N235, S236, S237 und D454.

Schalter-2 in Myosin-5 nimmt im nukleotidfreien Zustand eine neue, aber immer noch geschlossene Konformation ein, die damit verbundene *relay*-Helix befindet sich jedoch wieder in einer geraden Konformation. COUREUX et al. (2003) bezeichnen diesen nukleotidfreien Zustand als

rigor-like-Zustand. Dieser gilt mit geschlossener Aktinbindungsspalte, geschlossenem Schalter-2 und gerader *relay*-Helix als die, dem *rigor*-Zustand am nächsten liegende, bekannte Darstellung der dreidimensionalen Struktur von Myosin-5. Kristallographische Untersuchungen durch YANG et al. (2007) bzw. MÉNÉTREY et al. (2005) konnten den *rigor-like*-Zustand auch für Myosine der Klassen 2 und 6 nachweisen. YANG et al. (2007) zeigen, dass der in Myosin-5 geschlossene Schalter-2 auf sterische Effekte eines Tyrosins in dieser Region (Y439 in GgMyosin-5a) zurückzuführen ist und nicht in Myosin-2 auftritt, da dieses an der entsprechenden Position ein Alanin oder Serin (S456 in DdMyosin-2) aufweist. Ein weiterer Unterschied zwischen den *rigor-like*-Zuständen von Myosin-5 und Myosin-2 besteht darin, wie stark die Aktinbindungsspalte geschlossen ist. Diese liegt in Myosin-5, im Gegensatz zu Myosin-2, in fast vollständig geschlossenem Zustand vor. Der strukturelle Unterschied spiegelt die unterschiedlichen Affinitäten dieser Myosine zu Aktin im nukleotidfreien Zustand wieder. Die für Myosin-5 beschriebenen Abweichungen in den Konformationen von Schalter-2 und der Aktinbindungsspalte stellen vermutlich eine molekulare Anpassung dieses Myosins an seine Funktion als prozessiver Motor dar.

1.5 Kinetische Modelle der enzymatischen ATP-Umsetzung von Myosin

Neben der strukturellen Betrachtung des ATPase-Zyklus bieten auch kinetische Messungen die Möglichkeit, den enzymatischen Mechanismus der ATP-Umsetzung durch Myosin zu untersuchen. Bei der Analyse dieser Eigenschaften wird zwischen Fließgleichgewicht- (*steady state*-) und Transientenkinetik (Übergangszustand) unterschieden. Während im Zustand des Fließgleichgewichts die Edukt-Umsatz- sowie Produkt-Bildungsgeschwindigkeiten, und damit auch die Konzentration der Zwischenprodukte, konstant bleiben, beschreibt die Transientenkinetik die Zeitspanne bis zum Erreichen des *steady state*-Zustands. Die Untersuchung der kinetischen Parameter von Myosinen erfolgt häufig mithilfe lichtspektroskopischer Messverfahren. Zu den in dieser Arbeit angewandten Methoden zählen Absorptionsverfahren im Falle der Bestimmung der Fließgleichgewichtseigenschaften sowie Lichtstreuungs- und fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Charakterisierung von Reaktionsgeschwindigkeiten und Bindungskonstanten von Myosin.

1.5.1 *Steady state*-ATPase-Aktivität von Myosin

Um die ATPase-Aktivität eines Myosins im Fließgleichgewicht zu untersuchen, wird dieses mit einem großen Überschuss an ATP versetzt. Dadurch ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration, die bimolekulare Reaktion folgt dem Geschwindigkeitsgesetz pseudo 1. Ordnung. Obwohl die Umsetzung von ATP durch Myosin einen komplexen Reaktionsmechanismus darstellt, der aus vielen Einzelschritten besteht, kann die quantitative Beziehung zwischen ATP-Konzentration und Umsatzgeschwindigkeit entsprechend dem kinetischen Formalismus von MICHAELIS und Menten (1913) interpretiert werden (für eine detaillierte Herleitung dieser und der folgenden Gleichungen siehe FERSHT et al., 1985):

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[\text{ATP}]}{K_{\text{M(ATP)}} + [\text{ATP}]}$$

MALNASI-CZISMADIA et al., 2000) und so transientenkinetische Untersuchungen zur Interaktion von Myosin und Nukleotid durch Beobachtung dieser Fluoreszenzänderung ermöglicht.

BAGSHAW und Trentham (1974) stellen, basierend auf kinetischen Messungen mit Myosin S1 aus Kaninchen, ein 7-Schritt-Modell zur Beschreibung der Interaktion von Myosin mit Nukleotid auf, das als Grundlage auf alle Myosine übertragen werden kann. Eine Erweiterung des Bagshaw-Trentham-Schemas stellt das 8-Schritt-Modell von ZENG et al. (2004) dar (s. Abb. 6).

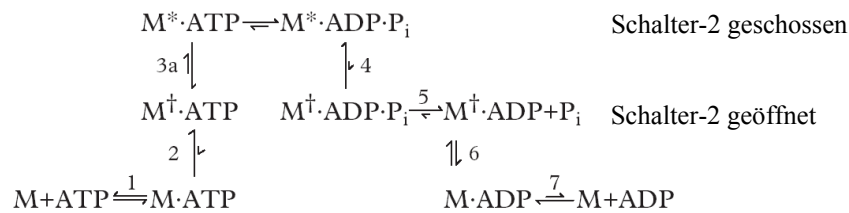
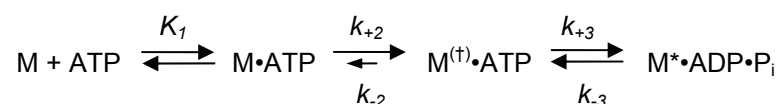


Abb. 6: 8-Schritt-Modell der Umsetzung von ATP durch Myosin (verändert nach ZENG et al., 2004)

Im ersten Schritt bindet ATP diffusionskontrolliert an Myosin (M). Die folgende, in der Regel nahezu irreversible, Isomerisierung von $M \cdot ATP$ zu $M^\dagger \cdot ATP$ (Schritt 2) führt zu einer Fluoreszenzzunahme. Mit dem Schließen von Schalter-2 (Schritt 3a), das die Hydrolyse von ATP einleitet, geht $M^\dagger \cdot ATP$ in $M^* \cdot ATP$ über. Dadurch kommt es zu einer weiteren starken Zunahme der Fluoreszenz. Das Öffnen von Schalter-2 im Anschluss an die Hydrolyse-Reaktion (Schritt 4) resultiert in der Isomerisierung von $M^* \cdot ADP \cdot P_i$ in $M^\dagger \cdot ADP \cdot P_i$ und damit in einer Abnahme der Fluoreszenz. Nach der Abgabe von P_i (Schritt 5) folgt die ADP-Dissoziation in zwei Stufen (Schritte 6 und 7), von denen die erste, der Übergang von $M^\dagger \cdot ADP$ in $M \cdot ADP$, mit einer weiteren Fluoreszenzabnahme verknüpft ist.

Die beschriebenen Fluoreszenzänderungen können nicht für alle Myosine beobachtet werden. So ist der Übergang von $M^\dagger \cdot ATP$ in $M^* \cdot ATP$ für *Dd*Myosin-2 nicht als Fluoreszenzänderung detektierbar. ZENG et al. (2004) führen dies auf Fluoreszenzlöschung durch zusätzliche Tryptophane im Molekül zurück. Als weiterer Grund wird das Fehlen zweier Tryptophane in *Dd*Myosin-2 am Eingang der Nukleotidbindungstasche (W113 und W131 in Skelettmuskelmyosin-2 aus Kaninchen) angesehen, da Myosine ohne diese beiden Tryptophane auch keine Signaländerung bei der Bindung von ADP zeigen. Im Falle solcher Myosine wird die, bei der Interaktion von Myosin mit ATP, beobachtete Fluoreszenzänderung dem Hydrolyseschritt zugeordnet (RITCHIE et al., 1993; WOODWARD et al., 1995; KURZAWA et al., 1997). Ein dementsprechend vereinfachtes Modell in Anlehnung an BAGSHAW und Trentham (1974) beschreibt die Bindung von ATP an solche Myosine:



In diesem und allen folgenden Reaktionsschemata, die transientenkinetische Reaktionen beschreiben, sind Gleichgewichtskonstanten groß (K) und Geschwindigkeitskonstanten (k) klein geschrieben. Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen, die in Anwesenheit von Aktin stattfinden, sind fett (**K**, **k**) geschrieben.

Die Geschwindigkeitskonstante der ATP-Bindung wird durch die Gleichung

$$k_{\text{obs}} = \frac{K_1 k_{+2} [\text{ATP}]}{1 + K_1 [\text{ATP}]}$$

beschrieben. Bei kleinen ATP-Konzentrationen vereinfacht sich der Formalismus zu

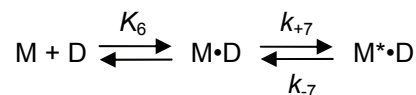
$$k_{\text{obs}} = K_1 k_{+2} [\text{ATP}].$$

In einer Auftragung von k_{obs} gegen die ATP-Konzentration entspricht die Steigung der daran angepassten Geraden der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung ($K_1 k_{+2}$). Bei höheren ATP-Konzentrationen folgen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten einer Hyperbel gemäß

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_{+3} + k_{-3}) [\text{ATP}]}{K_1 + [\text{ATP}]}.$$

Das Plateau der Hyperbel wird durch die Summe der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion des Hydrolyseschritts ($k_{+3} + k_{-3}$) beschrieben (BAGSHAW und Trentham, 1974).

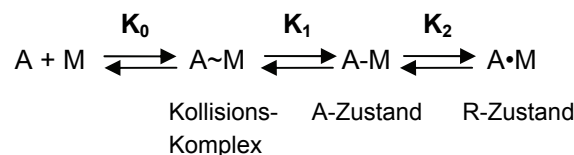
Die Interaktion von Myosin mit ADP (D) kann nach BAGSHAW und Trentham (1974) mit dem folgenden Schema dargestellt werden:



$K_6 k_{+7}$, auch als k_{+D} bezeichnet, stellt die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung dar. Die ADP-Dissoziation ist durch die Geschwindigkeitskonstante k_{-7} (auch k_{-D}) charakterisiert.

1.5.2.2 Interaktion von Myosin mit F-Aktin

GEEVES und Conibear beschreiben 1995 die Interaktion von Myosin mit F-Aktin als dreistufigen Prozess mit zunehmend stärkerer Bindung des Myosins an F-Aktin:



In einem ersten Schritt entsteht zunächst mit der Gleichgewichtskonstante K_0 ein Kollisionskomplex aus F-Aktin und Myosin. Dieser wird vorrangig durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Es folgt die Isomerisierung in den A-Zustand (*attached*-Zustand) mit der Gleichgewichtskonstante K_1 , bei der stereospezifische hydrophobe Interaktionen zwischen den beiden Reaktionspartnern auftreten. Mit dem Schließen der Aktinbindungsspalte kommt es zur Isomerisierung (*weak-to-strong*-Übergang) des schwach- in den stark-Aktin-gebundenen R-Zustand (*rigor*-Zustand)

(CONIBEAR et al., 2003). Diese ist durch die Gleichgewichtskonstante K_2 charakterisiert. Im R-Zustand hat das Myosin seine höchste Affinität zu Aktin erreicht.

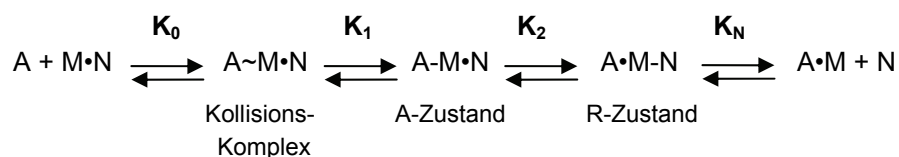
Eine spektroskopische Charakterisierung der Bindung von Myosin an Aktin ist durch die Fluoreszenzabnahme von fluoreszenzmarkiertem Pyren-Aktin oder durch die Zunahme der Lichtstreuung möglich, die mit der Ausbildung des Akto-Myosin-Komplexes einhergeht. Dabei kann jedoch nur zwischen Bindung und Dissoziation von Aktin unterschieden werden, sodass sich der obige Mechanismus zu



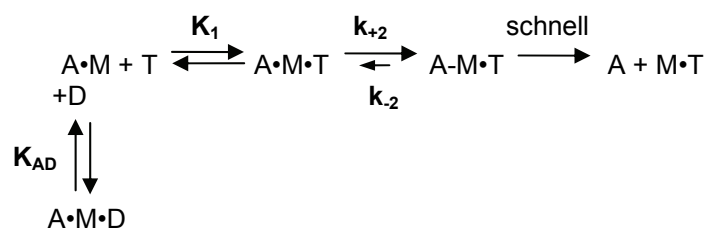
vereinfacht (SIEMANKOWSKI und White, 1984).

1.5.2.3 Interaktion von Myosin mit F-Aktin und Nukleotid

Das sogenannte 3G-Modell (GEEVES, Goody und Gutfreund, 1984), welches das oben dargestellte Modell der Aktin-Myosin-Interaktion von GEEVES und Conibear (1995) erweitert, beschreibt die Wechselwirkung des Akto-Myosin-Komplexes mit Nukleotid als kompetitives Bindungsmodell:



Während die Ausbildung des Kollisionskomplexes sowie die Isomerisierung zum A-Zustand nukleotidunabhängig sind, wird der Übergang in den R-Zustand stark durch die Anwesenheit von Nukleotid beeinträchtigt. Entsprechend der Vereinfachung des Modells zur Aktin-Myosin-Interaktion wurde auch das 3G-Modell durch Erkenntnisse aus transientenkinetischen Messungen (MILLAR und Geeves, 1983; SIEMANKOWSKI und White, 1984) umgewandelt zu



Die Bindung von ATP an Akto-Myosin ist durch die Gleichgewichtskonstante K_1 charakterisiert. Diesem, sich schnell einstellenden, Gleichgewicht folgt mit der Geschwindigkeitskonstante k_{+2} die geschwindigkeitsbestimmende und in der Regel nahezu irreversible Isomerisierung in den schwach Aktin-bindenden Myosin-ATP-Komplex (*strong-to-weak*-Übergang). Schließlich zerfällt in einem schnellen Schritt der Komplex zu Myosin-ATP und Aktin. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion wird analog dem Formalismus der ATP-Bindung an Myosin beschrieben. Bei höheren ATP-Konzentrationen folgen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten einer Hyperbel gemäß der Gleichung

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{+2}[\text{ATP}]}{K_1 + [\text{ATP}]}$$

Bei Anwesenheit von ATP und ADP konkurrieren die beiden Nukleotide um die Bindung an Akto-Myosin. ADP kann ebenfalls in einem schnellen Gleichgewicht an Akto-Myosin binden, welches durch die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_{AD} beschrieben wird. Eine experimentelle Bestimmung der Affinität von ADP zu Akto-Myosin ist mit der Messung der ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes möglich. Dabei wird die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Pyren-Akto-Myosin-Komplexes durch einen hohen Überschuss an ATP in Abwesenheit von ADP gemessen (k_0). Die bimolekulare Reaktion lässt sich durch ein Geschwindigkeitsgesetz pseudo 1. Ordnung beschreiben. In Anwesenheit von steigenden ADP-Konzentrationen wird durch Bindung von ADP zunehmend mehr Akto-Myosin der ATP-induzierten Dissoziation entzogen. Die Hyperbel

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0}{1 + \frac{[\text{ADP}]}{K_{\text{AD}}}}$$

beschreibt die Abnahme der Konzentration an Akto-Myosin und damit auch der beobachteten Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}).

Betrachtet man die Reaktionen von Myosin mit ADP und Aktin als thermodynamisch geschlossenes System, lassen sich die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten, die die Interaktion von Myosin mit F-Aktin und ADP beschreiben, als sogenannte thermodynamische Kopplungen darstellen, die der Gesetzmäßigkeit

$$\frac{K_{\text{AD}}}{K_{\text{D}}} = \frac{K_{\text{DA}}}{K_{\text{A}}}$$

gehörten. Hohe Kopplungskonstanten kennzeichnen Myosine, deren Affinitäten zu Aktin bzw. ADP durch den jeweils anderen Bindungspartner stark beeinflusst werden. Der physikalisch-mathematische Zusammenhang der vier Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_{AD} , K_{D} , K_{DA} und K_{A} ist zur Verdeutlichung in Abb. 7 graphisch dargestellt.

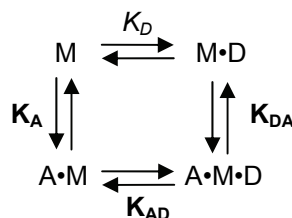


Abb. 7: Graphische Darstellung der thermodynamischen Kopplung der vier Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{AD} , K_{D} , K_{DA} und K_{A} (RITCHIE et al., 1993)

1.6 Mechanismen der Prozessivität

Die Fähigkeit zu prozessiver Bewegung ermöglicht es einzelnen Myosinmolekülen, größere Distanzen im Bereich von mehreren hundert Nanometern entlang eines Aktinfilaments zurückzulegen, ohne von diesem zu dissoziieren. Dies ist besonders für Myosine von Bedeutung, die in den vesikulären Transport involviert sind, da so ein einzelnes Myosinmolekül Organellen und Vesikel über eine längere Strecke transportieren kann. Für prozessive Myosine der Klasse-5 wird ein sogenannter *hand-over-hand* Mechanismus zur Fortbewegung entlang von Aktinfilamenten postuliert (YILDIZ et al., 2003; WARSHAW et al., 2005). Das Molekül bewegt sich dabei in 36-nm Schritten. Dieser Abstand wird durch die Windung des Aktinfilaments vorgegeben und setzt sich nach VEIGEL et al. (2002) aus einem zweiphasigen Kraftschlag (20 + 5 nm) sowie einer durch Diffusion angetriebenen Bewegung der Motordomäne (10 - 16 nm) zusammen. Für die prozessive Bewegung von Klasse-5 Myosinen wird ein spannungssensitiver Mechanismus postuliert, der die Kinetik der Einzelschritte des ATPase-Zyklus beider Myosinköpfe koordiniert (ROSENFELD und Sweeney, 2004; VEIGEL et al., 2005; ROSENFELD et al., 2005). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass zu jeder Zeit zumindest einer der beiden Köpfe an Aktin gebunden und so eine effektive prozessive Bewegung entlang des Aktinfilaments möglich ist. Im Folgenden wird dieser Mechanismus anhand von Abb. 8 dargestellt.

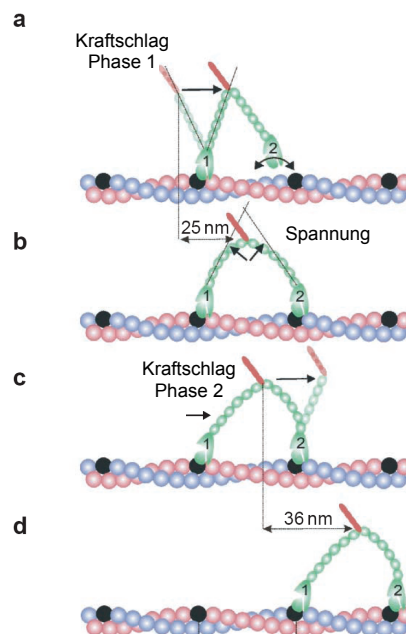


Abb. 8: *hand-over-hand* Mechanismus der prozessiven Bewegung von Myosin-5 (verändert nach VEIGEL et al., 2002)

Kopf 1 des Myosin-5 Moleküls in Abb. 8 (a) ist als Mg^{2+} -ADP-Komplex an das Aktinfilament gebunden und führt die erste Phase seines Kraftschlags aus. Währenddessen liegt Kopf 2 als Mg^{2+} -ADP- P_i -Komplex frei vor und diffundiert entlang des Aktinfilaments zur nächsten Aktin-Bindungsstelle, an die er schließlich bindet (b). Gemäß VEIGEL et al., 2002 kommt es durch die Assoziation beider Köpfe mit F-Aktin in einem Abstand von 36 nm, welcher über die Länge des Kraftschlags von 25 nm hinausgeht, zum Aufbau intramolekularer Spannung. Die im ATPase-Zyklus von Kopf 2 folgende P_i -Dissoziation geht normalerweise mit der ersten Phase des Kraftschlags einher. Aufgrund sterischer Hinderung kann diese Hebelarmbewegung jedoch nicht stattfinden, solange Kopf 1

an Aktin gebunden ist. Ob es trotzdem zu der P_i -Abgabe von Kopf 2 kommt, und der nicht ausführbare Kraftschlag zusätzlich die intramolekulare Spannung erhöht, ist nicht geklärt. Kinetische Studien zu Myosin-5 durch ROSENFELD und Sweeney (2004) sowie ROSENFELD et al. (2005) lassen jedoch vermuten, dass der P_i -Rest dissoziiert und beide Köpfe als Mg^{2+} -ADP-Komplex an Aktin gebunden vorliegen, wie es auch das von RIEF et al. (2000) vorgeschlagene Modell beschreibt. Die so erzeugte intramolekulare Spannung bewirkt eine Verlangsamung der Mg^{2+} -Abgabe und in Folge eine 50-fache Verlangsamung der ADP-Dissoziation aus Kopf 2 (ROSENFELD und Sweeney, 2004). Durch die Dissoziation des Mg^{2+} -Ions von Kopf 1 kommt es zu Konformationsänderungen von P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 der Nukleotidbindungstasche (ROSENFELD et al., 2005; COUREUX et al., 2004). Diese strukturellen Änderungen resultieren in dem Übergang des stark- in den schwach ADP-bindenden Akto-Myosinkopf 1-Komplex und schließlich in der ADP-Abgabe. Mit der Mg^{2+} -ADP-Dissoziation geht die zweite Phase des Kraftschlags dieses Kopfes einher (c) (ROSENFELD et al., 2000; COUREUX et al., 2004). Nach der Abgabe von ADP folgt die schnelle Bindung von ATP an Kopf 1 (d). Die damit verbundene Dissoziation dieses Kopfes vom Aktinfilament resultiert in der Auflösung der intramolekularen Spannung und der Ausführung der ersten Kraftschlagphase von Kopf 2. Schließlich hydrolysiert Kopf 1 ATP und liegt frei als ADP· P_i -Komplex vor.

Die kinetischen Eigenschaften verschiedener Klasse-5 Myosine unterstützen das oben beschriebene Modell prozessiver Bewegung, das auf der Spannungssensitivität der Myosine basiert (DE LA CRUZ et al., 1999, TAFT et al., 2008). So weisen Klasse-5 Myosine eine kleine thermodynamische Kopplungskonstante auf. Die Bindung an Aktin führt nur zu einer geringfügigen Erniedrigung der Affinität des Myosins zu ADP, die Mg^{2+} -ADP-Dissoziation des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des ATPase-Zyklus. Dies resultiert in einer hohen Verweildauer des Myosins im Aktin-gebundenen Zustand. Aufgrund ähnlicher kinetischer Eigenschaften wird eine mit Myosin-5 vergleichbare Generierung prozessiver Bewegung auch für Myosine der Klassen 7 und 11 vorgeschlagen (YANG et al., 2006; HACHIKUBO et al., 2007).

1.7 Regulation von Myosinen durch freie Mg^{2+} -Ionen

Zur Regulation der Motoraktivität von Myosinen hat sich eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen entwickelt. Die bis heute am besten verstandenen Regulationsmechanismen basieren auf der Phosphorylierung der schweren oder leichten Ketten oder der Ca^{2+} -abhängigen Bindung der leichten Ketten an die Nackendomäne (BOSGRAAF und van Haastert, 2006; SELLERS et al., 2008). Die resultierenden Veränderungen beinhalten Modulationen der Rigidität der Nackendomäne, der Affinität des Myosins zu Aktin oder der ATP-Umsetzung. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl Myosin-2 aus glattem Muskel durch Phosphorylierung der Schwanzdomäne (WENDT et al., 2001) als auch Klasse-5 Myosine durch Ca^{2+} -Bindung an die leichten Ketten (THIRURMURUGAN et al., 2006) in einem Gleichgewicht zwischen aktiver entfalteter und inaktiver gefalteter Konformation stehen.

In Anlehnung an das Thema dieser Arbeit wird hier näher auf einen Regulationsmechanismus eingegangen, der auf Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ($[Mg^{2+}_{\text{frei}}]$) beruht und für verschiedene Myosine der Klassen 1 und 5 beschrieben wird. Zum ersten Mal wurde eine solche Regulation für Myosin-1D aus *D. discoideum* beobachtet (FUJITA-BECKER et al., 2005). Die Untersuchung zeigt den Einfluss von freien Mg^{2+} -Ionen auf die Affinität des Akto-Myosin-Komplexes

zu ADP und die *in vitro*-Motilität dieses Myosins. Niedrige Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen im physiologischen Bereich bewirken eine geringere Affinität des Akto-Myosin-Komplexes zu ADP sowie eine erhöhte Aktin-Gleitgeschwindigkeit in *in vitro*-Motilitätsexperimenten. ROSENFELD et al. (2005) stellen anhand der Analyse von GgMyosin-5a fest, dass auch die kinetischen Eigenschaften dieses Myosins durch freie Mg^{2+} -Ionen moduliert werden. Der von ihnen postulierte Mechanismus beruht auf einer sequentiellen Produktabgabe von Myosin- Mg^{2+} -ADP- P_i . Unter physiologischen Bedingungen erfolgt nach der Bindung an F-Aktin die Dissoziation von P_i , Mg^{2+} und schließlich ADP. Niedrige Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen beschleunigen die Mg^{2+} -Dissoziation und in Folge die anschließende ADP-Abgabe. Dies resultiert in der Destabilisierung des stark Aktin-bindenden Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes und einer Erniedrigung der *duty ratio* des Myosins. Ein vergleichbarer Effekt der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen auf die ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin wurde auch für DdMyosin-1E und DdMyosin-5b nachgewiesen (DÜRRWANG et al., 2006; TAFT et al., 2008). Auf Basis kinetischer und zellulärer Studien wird die Steuerung der Funktion dieser beiden Myosine durch Regulation ihrer kinetischen Eigenschaften mittels Veränderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen vermutet. TAFT et al. (2008) beobachteten in *D. discoideum* Fluktuationen der lokalen Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen im Millisekundenbereich. Ähnlich schnelle Konzentrationsänderungen treten auch in Säuger-Zellen auf (FARRUGGIA et al., 2006; SUZUKI et al., 2002). Trotz eines bis heute fehlenden Nachweises der Regulation von Myosinen durch freie Mg^{2+} -Ionen *in vivo* ist anzunehmen, dass der beschriebene Regulationsmechanismus von physiologischer Relevanz ist.

1.8 Molekulares *Engineering* von Myosin-Motoren

Das gezielte Konstruieren und Verändern von Proteinen, das sogenannte „*Protein Engineering*“, bietet die Möglichkeit, die Beziehung zwischen bestimmten strukturellen Eigenschaften eines Proteins und den Mechanismen, die seiner biologischen Funktion zu Grunde liegen, zu erforschen. Neue Ansätze des *Protein Engineerings* erlauben die Herstellung von Enzymen mit gesteigerter katalytischer Effizienz und spezifisch veränderten oder neu eingeführten Funktionen. Diese Methode eignet sich in besonderer Weise zur Untersuchung der Myosinmotordomäne, da die von ihr erzeugten konformationellen Veränderungen mit einer Reihe von Techniken verfolgt werden können, darunter die Beobachtung spektroskopischer Signale oder, durch den katalytischen Zyklus bedingter, chemischer Umwandlungen.

Einen Meilenstein im *Protein Engineering* von Myosinen stellt die Entwicklung eines künstlichen Hebelarms durch ANSON et al. (1996) dar. Die Autoren verknüpften die Motordomäne von DdMyosin-2 mit der rigiden Struktur zweier Spektrin-ähnlicher Domänen des α -Aktininmoleküls aus *D. discoideum* („2R“) und ersetzten so die natürliche Nackenregion des Myosins. *In vitro*-Motilitätsmessungen zur Messung der Geschwindigkeit des Motors sowie die Bestimmung der Länge des Kraftschlags (RUFF et al., 2001) bestätigten auf Basis der *swinging lever arm*-Theorie (HOLMES et al., 1997) die Funktionalität dieses künstlichen Myosins, dessen dreidimensionale Struktur schließlich durch Kliche et al. (2001) aufgeklärt wurde. Eine Überexpression vieler Myosine mit natürlicher Nackenregion ist bis heute nicht möglich, da die entsprechenden leichten Ketten, die sie stabilisieren und zu einem rigiden Hebelarm machen, oft nicht bekannt sind. Die Verknüpfung der Myosinmotordomänen mit dem beschriebenen künstlichen Hebelarm ermöglicht jedoch die Produktion dieser Myosine und damit Untersuchungen zur

in vitro-Motilität und Krafterzeugung (z. B. ITO et al., 2003; HACHIKUBO et al., 2007; TAFT et al., 2008).

Die Einführung eines C-terminalen Leucin-Zippers in Myosinkonstrukte, welche sich aus der Motordomäne sowie nativer Nacken- und *coiled-coil* Region zusammensetzen, dient der Stabilisierung des dimeren Zustands dieser Moleküle und stellt einen weiteren *Protein Engineering*-Ansatz in der Myosinforschung dar. So kann u. a. der Einfluss der dimeren Struktur auf die kinetischen und funktionalen Eigenschaften des Motors untersucht werden. Dadurch wurden entscheidende Einblicke in das prozessive Verhalten von Myosinen der Klassen 5 und 6 und den Mechanismus, der den Bewegungsablauf der beiden Motordomänen dieser Myosine koordiniert, erhalten (ROSENFELD und Sweeney, 2004; ROSENFELD et al., 2005; SWEENEY et al., 2007). Die prozessive Bewegung eines Klasse- 7 Myosins aus *D. melanogaster* wurde ebenso durch Studien an einem solchen künstlichen dimeren Myosinkonstrukt nachgewiesen (YANG et al., 2006).

Mittels *Protein Engineering*-Methoden gelang es schließlich auch, einen künstlichen rückwärts laufendes Myosin zu konstruieren (TSIAVALIARIS et al., 2004). Mit diesem artifiziellen Motor konnte gezeigt werden, dass die Direktionalität von Myosinen nicht durch die Kernstruktur der Motordomäne sondern durch die Ausrichtung der Nackenregion bestimmt wird. Dies wurde anhand der dreidimensionalen Struktur des natürlich rückwärtslaufenden Myosin-6 bestätigt (MÉNÉTREY et al., 2005). Die aus solchen künstlich hergestellten Myosinen gewonnenen Erkenntnisse werden in der Zukunft den gezielten Bau von molekularen Motoren mit gewünschten kinetischen, funktionalen und mechanischen Eigenschaften und ihren Einsatz in nanotechnologischen und medizinischen Bereichen ermöglichen.

1.9 *Dictyostelium discoideum*

1.9.1 Lebenszyklus von *Dictyostelium*

Dictyostelium (Mycetozoa) ist ein niederer Eukaryont und zählt zu den zellulären Schleimpilzen (s. Abb. 9 (A)). Diese weisen Ähnlichkeiten mit Pflanzen (Produktion von Zellulose, Nutzung von Ethylen als Hormon), Pilzen (Sporenbildung) und Protozoa (Motilität) auf, wodurch ihre taxonomische Einordnung umstritten ist (MADIGAN et al., 2001). Der natürliche Lebensraum von *Dictyostelium* ist der Waldboden, wo sich die Einzeller von Bakterien und Hefen ernähren, welche über Phagozytose aufgenommen werden (RAPER, 1935). Unter optimalen Bedingungen vermehrt sich *Dictyostelium* durch mitotische Teilung. Bei Nahrungsmangel wird allerdings durch Produktion und Sekretion von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) durch eine hungrige Zelle ein definierter Differenzierungsprozess initiiert (GERISCH und Wick, 1975). Benachbarte Zellen detektieren das cAMP über Membranrezeptoren. Dies löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die zu veränderter Genexpression, u. a. der hohen Expression einer aktivierbaren Adenylatcyclase führt (PITT et al., 1992), wodurch nun auch diese Zellen cAMP sezernieren. Gleichzeitig bewegen sich die Zellen in Strömen in Richtung des cAMP-Gradienten zu der Ursprungszelle hin und bilden einen Zellhaufen aus etwa 10^5 Zellen. Dieser ist von einer extrazellulären Matrix aus Mucopolysacchariden und Zellulose umgeben. Daraus entsteht das sogenannte Pseudoplasmodium, ein „wurmähnlicher“, phototaktischer Zellverband mit einer Länge von 1 - 2 mm, der Zelldifferenzierung und Morphogenese unterliegt. Mit Eigenschaften wie Polarität, Proportionierung und Regulation sowie einem Organisationszentrum ähnelt es einem Embryo (KESSIN, 2001). Das Pseudoplasmodium durchläuft weitere Entwicklungsstadien, in

denen die Zellen zu zwei Hauptzelltypen, Prästiel- und Präsporenzellen, differenzieren (FIRTEL, 1995). Schließlich kommt es beim Erreichen eines geeigneten Platzes zur Ausbildung eines Fruchtkörpers (s. Abb. 9 (B)). Dieser besteht aus einem Stiel aus toten, vakuolisierten Zellen und einem Sporenkopf, der, von einer schützenden Zellulosekapsel umgebene, metabolisch inaktive Sporen enthält und bei Berührung platzt (LOOMIS, 1975). Unter günstigen Bedingungen beginnen die Sporen zu keimen und es entwickeln sich daraus wieder teilungsfähige Einzeller.

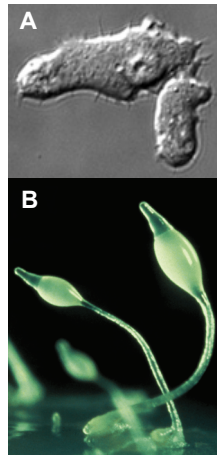


Abb. 9: *Dictyostelium discoideum*. **(A)** Lichtmikroskopische Aufnahme einer *D. discoideum* Zelle (<http://www.nigms.nih.gov/NR/rdonlyres/3B01C4EE-93DD-429E-8346-62A1FA5A14BD/dicty.jpg>). **(B)** Fruchtkörper von *D. discoideum* (M. J. Grimson und R. L. Blanton, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA)

1.9.2 *D. discoideum* als Expressionssystem für Myosine

Die am besten untersuchte *Dictyostelium*-Spezies ist *D. discoideum*. Sie gilt neben *S. cerevisiae* als eukaryontischer Modellorganismus, an dem Struktur, Regulation und Dynamik des Zytoskeletts, Signaltransduktion und Zell-Zelladhäsion, also Prozesse, die in vielfacher Hinsicht denen in Säugerzellen wie z. B. Leukozyten ähneln, untersucht werden können (RIVERO, 2003; SOLDATI, 2003). Vor allem aber dient *D. discoideum* als hochmotiler Organismus der Untersuchung von Bewegungsprozessen wie Zellbewegung, Zellteilung, Organelltransport und Endozytose. Zur Ausführung dieser Vorgänge exprimiert *D. discoideum* 13 Myosine aus fünf verschiedenen Klassen (KOLLMAR, 2006). Diese natürlichen Gegebenheiten führten zu der Nutzung des Organismus als hocheffizientes Proteinexpressionssystem für Myosine und Myosinfragmente (MANSTEIN und Hunt, 1995). Modifizierte *D. discoideum* Stämme (AX2, AX3) ermöglichen die leichte und günstige Kultivierung in axenischem Nährmedium (SUSSMAN und Sussman, 1967; WATTS und Ashworth, 1970; LOOMIS, 1971). Zur Transfektion von *D. discoideum* wird standardmäßig die Elektroporation genutzt. Es wurde dafür eine Reihe von Plasmiden entwickelt, als Selektionsmarker dienen Resistenzgene gegen Antibiotika wie Geneticin oder Blastocidin (MANSTEIN et al., 1995; KNETSCH et al., 2002). Die Expression von Myosinen in *D. discoideum* ermöglichte die Aufklärung der atomaren Strukturen der endogenen Myosine Myosin-2 (z. B. SMITH und Rayment, 1996; GULICK et al., 1997; BAUER et al., 1997) und Myosin-1E (KOLLMAR et al., 2002). Desweiteren gelang es durch Verwendung des Expressionssystems *D. discoideum*, eine hohe Zahl an Konstrukten endogener Myosine der Klassen 1, 2, und 5 (z.B. FUJITA-BECKER et al., 2005; MANSTEIN et al., 1989a; TAFT et al., 2008) sowie rekombinanter Konstrukte pflanzlicher Klasse-11 Myosine aus *C. corallina* (ITO et al., 2003) und *A. thaliana* (HACHIKUBO et al., 2007) kinetisch und funktional zu charakterisieren.

Im Folgenden werden vier Myosine aus *D. discoideum* näher beschrieben, die Gegenstand dieser Arbeit waren.

1.9.3 *DdMyosin-1B*

DdMyosin-1B ist eines der drei amöboiden Klasse-1 Myosine in *D. discoideum* und lokalisiert während der Zellbewegung an Ausstülpungen der Plasmamembran (JUNG et al., 1996; FUKUI und Inoue, 1997; SENDA et al., 2001). Es wird vermutet, dass *DdMyosin-1B* u. a. durch die Interaktion mit dem Adapterprotein CARMIL bei der Rekrutierung von Bestandteilen des Arp2/3-Komplexes zur Aktinpolymerisation eine wichtige Rolle zu spielt (JUNG et al., 2001). Eine umfangreiche Charakterisierung der Motordomäne dieses Myosins fand durch TSIIVALIARIS et al. (2008) statt. In dieser Studie, die auch Teile der vorliegenden Arbeit enthält, konnte gezeigt werden, dass *DdMyosin-1B* neben einer kurzen Verweildauer am Aktinfilament die schnellsten Nukleotidbindungskonstanten sowie die höchste *in vitro*-Motilität aller bis heute untersuchten Klasse-1 Myosine aus *D. discoideum* aufweist. Im Gegensatz zu *DdMyosin-1D* und *DdMyosin-1E* wird die Motoraktivität von *DdMyosin-1B* nicht durch freie Mg^{2+} -Ionen beeinflusst. Die kinetischen und funktionalen Eigenschaften dieses Myosins sind daher mit *DdMyosin-2* und Skelettmuskelmyosin-2 aus Kaninchen vergleichbar.

1.9.4 *DdMyosin-1E*

DdMyosin-1E zählt zu den Klasse-1 Myosinen mit kurzer Schwanzdomäne und ist in den Prozess der Phagozytose involviert (DÜRRWANG et al., 2006). Der Motor lokalisiert an den becherförmigen Einbuchtungen der Zellmembran, die der Aufnahme von Partikel und Zellen dienen, und den frühen Phagosomen. In seinen kinetischen Eigenschaften unterscheidet sich *DdMyosin-1E* wesentlich von *DdMyosin-1B*. Die hohe maximale ATP-Umsatzgeschwindigkeit in Anwesenheit von Aktin wird durch eine langsame ADP-Dissoziation des Akto-Myosin-ADP-Komplexes limitiert. Dies trägt maßgeblich zu der hohen *duty ratio* des Myosins bei. Darüber hinaus ist *DdMyosin-1E* durch eine sehr schnelle ATP-Hydrolyse sowie eine kleine thermodynamische Kopplungskonstante gekennzeichnet. Es zeigt damit Ähnlichkeiten zu prozessiven Klasse-5 Myosinen (DE LA CRUZ et al., 1999; TAFT et al., 2008). Wie im Fall von *GgMyosin-5a* und *DdMyosin-5b* wird auch die Motoraktivität von *DdMyosin-1E* durch freie Mg^{2+} -Ionen moduliert. Niedrige Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen beschleunigen die ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin und ermöglichen schnelle Bewegung, während hohe Konzentrationen die Verweildauer des Myosins im stark-Aktin-gebundenen Akto-Myosin-ADP-Zustand verlängern. Dies lässt darauf schließen, dass *DdMyosin-1E* in Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen als schneller einzelner Motor fungiert oder in kleinen koordinierten Gruppen arbeitet.

1.9.5 *DdMyosin-2*

Myosin-2 aus *D. discoideum* zählt zu den nicht-muskulären konventionellen Myosinen. Anhand von *DdMyosin-2-knock-out*-Zellen, i. e. Zellen, in denen das Myosin-2 Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass es wichtige Aufgaben für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur übernimmt, da bei diesen Zelllinien Chemotaxis, Zellteilung, Sporogenese sowie die Entwicklung in Suspensionskultur stark beeinträchtigt sind (KNECHT und Loomis, 1987; MANSTEIN et

al., 1989b). Die kinetischen Parameter von *DdMyosin-2* sind an die Funktion des Myosins angepasst und gewährleisten ein schnelles Durchlaufen des ATPase-Zyklus (RITCHIE et al., 1993; WOODWARD et al., 1995; KURZAWA et al., 1997). Aktin beeinflusst die ADP-Affinität des Myosins, indem es die ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin stark beschleunigt. *DdMyosin-2* zählt dementsprechend zu den „gekoppelten“ Myosinen. Geschwindigkeitslimitierend für die ATP-Umsetzung ist die Hydrolyse-Reaktion. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation sowie einer schnellen Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes ist die Verweildauer von *DdMyosin-2* am Aktinfilament nur kurz. Die Loslösung des Myosinfilaments von F-Aktin wird durch die hohe Anzahl an Myosinköpfen in einem Filament verhindert, von denen zu jeder Zeit zumindest einige stark an F-Aktin gebunden sind.

1.9.6 *DdMyosin-5b*

D. discoideum besitzt zwei Myosine der Klasse-5: Myosin-5a und Myosin-5b (HAMMER III. und Jung, 1996; KOLLMAR, 2006). *DdMyosin-5b* weist auch Sequenzhomologien zu pflanzlichen Klasse-11 Myosinen auf (PETERSON et al., 1996), es wird jedoch heute nach entsprechenden Sequenzvergleichen der Klasse-5 zugeordnet. Wie andere Klasse-5 Myosine zeigt auch *DdMyosin-5b* kinetische Eigenschaften eines prozessiven Motors. Dazu zählen eine hohe Affinität zu Aktin in Anwesenheit von ADP, eine schnelle ATP-Hydrolyse im Aktin-ungebundenen Zustand sowie eine schnelle maximale ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Aktin, deren Geschwindigkeit durch die ADP-Dissoziation des Akto-Myosin-ADP-Komplexes limitiert wird (TAFT et al., 2008). Dieser Schritt des ATPase-Zyklus wird, wie bei *DdMyosin-1E*, durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert. Physiologische Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen beeinflussen so den zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus, den *DdMyosin-5b* im stark Aktin-gebundenen Zustand verbringt. Es wird daher postuliert, dass es sich bei diesem Myosin um einen Motor mit modulierbarer Prozessivität handelt. Dieser Regulationsmechanismus würde es *D. discoideum* ermöglichen, *DdMyosin-5b* in Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen als langsamen prozessiven oder schnellen nicht-prozessiven Motor einzusetzen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Lokalisation des Motors an der kontraktilen Vakuole von *D. discoideum*. Diese Organelle stellt ein dynamisches tubulär-vesikuläres System zur Osmoregulation dar. *DdMyosin-5b* könnte sowohl bei der flexiblen Verankerung der Zisternen und Tubuli innerhalb des Aktinzytoskeletts als auch bei der aktiven Kontraktion der Vakuole zur Regulation des Flüssigkeitsaustauschs eine Rolle spielen.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularen Grundlagen der Bewegung prozessiver und nicht-prozessiver Myosine sind trotz umfangreicher Untersuchungen nicht vollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit kinetischen, strukturellen und funktionalen Aspekten des Bewegungsmechanismus dieser Motoren.

- Für verschiedene Myosine der Klassen 1 und 5 wurde die Regulation der Motoraktivität durch freie Mg^{2+} -Ionen beschrieben. Der Regulationsmechanismus beruht auf der Modulation der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit und wirkt sich so unmittelbar auf die *duty ratio* der Myosine aus. Ein Sequenzvergleich des Schalter-2 Motivs von Myosinen verschiedener Klassen und Organismen lässt auf eine entscheidende Rolle einer nicht konservierten Aminosäure in

dieser Region bei der Generierung einer hohen *duty ratio* und der Vermittlung der Mg^{2+} -Sensitivität schließen. Mit der Darstellung und umfassenden kinetischen Charakterisierung der vier Myosine *DdMyosin-1B*, *DdMyosin-1E*, *DdMyosin-5b* und *DdMyosin-2* mit einer Mutation dieser Aminosäure in Schalter-2 sollte die Grundlage des molekularen Mechanismus, der Myosine mit niedriger von solchen mit hoher *duty ratio* unterscheidet, sowie der Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen untersucht werden.

- Der Struktur-basierte *in silico*-Entwurf und die Darstellung eines künstlichen dimeren Myosins mittels *Protein Engineering*-Methoden sollte dazu beitragen, die Voraussetzungen für prozessives Laufverhalten näher zu definieren. Mit Ausnahme der Motordomäne von *DdMyosin-5b* sollte dieser Motor keine Bestandteile der Polypeptidkette eines Myosins enthalten. Die funktionale Untersuchung eines solchen Motors auf Einzelmolekülebene kann Einblicke in die molekulare Grundlage von Prozessivität und den spannungssensitiven Mechanismus der Koordination der beiden Motordomänen geben. Darüber hinaus können die Notwendigkeit leichter Ketten für Prozessivität und ihre Funktion bei der Vermittlung intramolekularer Spannung untersucht werden.
- Ein Klasse-11 Myosin aus *Nicotiana tabacum* (*NtMyosin-11*) stellt den schnellsten bekannten prozessiven Motor dar (TOMINAGA et al., 2003). Mithilfe einer umfangreichen kinetischen Charakterisierung sollte der ATPase-Zyklus dieses Myosins analysiert werden. Der Vergleich mit prozessiven Myosinen anderer Klassen kann Aufschluss darüber geben, ob das prozessive Verhalten von Klasse-11 Myosinen mit den bestehenden Modellen beschreibbar ist und welche spezifischen Anpassungen kinetischer Parameter *NtMyosin-11* zu der schnellen prozessiven Bewegung befähigen.

KAPITEL II

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid:Bisacrylamid 37.5:1 (40 %)	AppliChem
Agar Bacteriological	OXOID
Agarose (Top Vision LE GQ)	MBI Fermentas
Anti-FLAG [®] M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich
APS	Serva
ADP	Fluka
ATP, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	Becton, Dickenson & Co
Benzamidinhydrochlorid·H ₂ O	Merck
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich
CaCl ₂ ·H ₂ O	Merck
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	Fluka
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
DTT	Sigma-Aldrich
EDTA (Titrplex II)	Merck
EGTA (Titrplex VI)	Merck
Essigsäure 100 %	J. T. Baker
Essigsäurepentylester 99 %	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FLAG Peptid	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Glycin	Sigma-Aldrich
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
HEPES >99.5 %	Sigma-Aldrich
Imidazol	BDH Laboratory Supplies

IPTG	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	J. T. Baker
KCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
KOAc	Merck
KOH-Plätzchen	Merck
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Hansano
mant-ATP	Jena Biosciences
mant-ADP	Jena Biosciences
β-Mercaptoethanol 14.3 M	Sigma-Aldrich
MES	Sigma-Aldrich
Methanol absolut	J. T. Baker
Methylcellulose	Sigma
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	Merck
MgCl ₂ -Lösung, 4,9 M, titriert	Sigma-Aldrich
Mg(OAc) ₂ ·4 H ₂ O	Fluka
MnCl ₂	Fluka
MOPS	Fluka
NaCl	Sigma-Aldrich
NaCl SigmaUltra	Sigma-Aldrich
Na ₂ CO ₃	Merck
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Fluka
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	Fluka
NaN ₃	Merck
NaOAc	Merck
NaOH-Plätzchen	Merck
Na ₃ VO ₄ 99.98 %	Sigma-Aldrich
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka
NADH, Dinatriumsalz	Roche
NiNTA Superflow	Qiagen
NiSO ₄ ·6 H ₂ O	Merck
PCR Nucleotide Mix (10 mM each dNTP)	Roche
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
PEP	Roche
PMSF	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (85 %)	J. T. Baker
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Proteose Peptone	Becton, Dickenson & Co
N-(1-pyrenyl)iodoacetamid	Fluka
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich

Salzsäure konz. (37 %)	J. T. Baker
SDS	Merck
Sucrose	Sigma-Aldrich
TAME	Fluka
Trichloressigsäure	Fluka
TEMED	Merck
TLCK	Merck
TPCK	Sigma-Aldrich
Tris	Merck
Triton-X 100	Merck
Tween-20	Merck
X-Gal	Sigma
ENZYME	
Calf Intestine Alkaline Phosphatase 1 U/μl	Boehringer-Mannheim
Ribonuclease A 90 Kunitz-U/mg lysophil.	Serva
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Phusion TM High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Lactatdehydrogenase 550 U/mg	Roche Diagnostics GmbH
Pyruvatkinase 200 U/mg	Roche Diagnostics GmbH
Apyrase >200 U/mg lysophil.	Sigma
ANTIBIOTIKA	
Ampicillin	GIBCO
Penicillin G 10000 U/ml / Streptomycin 10000 μg/ml	GIBCO
G418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem
MARKER	
GeneRuler 1 kB DNA-Leiter	MBI Fermentas
(10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 Bp)	
Page Ruler Protein Ladder 10-200 kDa	US Biological
(200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa)	
BenchMark TM Protein Ladder	Invitrogen
(220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa)	
ANTI-KÖRPER	
Monoklonaler Maus-IgG Anti-(His) ₅ -Antikörper 0.2 mg/ml	Qiagen
Ziege IgG anti-Maus, HRP-konjugiert 10 μg/ml	Pierce

2.1.2 Geräte

Zentrifuge Avanti Centrifuge J-20 XP	Beckman Coulter
Rotoren: - JLA 16.250	
- JA 25.50	
Zentrifuge Avanti Centrifuge J-HC	Beckman Coulter
Rotoren: - JS 4.2	
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Ultrazentrifuge Optima LE-80 K	Beckman Coulter
Rotoren: - 70 Ti	
- 45 Ti	
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
FPLC-Anlage Biotech ÄKTA-Purifier 10	Amersham Pharmacia
Chromatographiesäulen XK16/20	Amersham Biosciences
Anionenaustauschersäule High Trap Resource Q	Pharmacia Biotech
Gelfiltrationssäule Highload 26/60 Superdex 200 PG	Amersham Biosciences
Superloop 50 ml bzw. 150 ml	Amersham Biosciences
Sampleloop 7.8 ml	Amersham Biosciences
Ultraschallgerät Sonoplus HD2200	Bandelin
Spannungsquelle Power-Pac 300	Bio-Rad
Spannungsquelle Power-Pac Basic 300 V/400 mA/75 W	Bio-Rad
SDS-PAGE-Apparatur Mini-Protean	Bio-Rad
Western-Blot-Apparatur Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell	Bio-Rad
Geldokumentationssystem Chemidoc	Bio-Rad
Photometer DU 800 Spectrophotometer	Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskop CK 2	Olympus
Elektroporator Gene Pulser Xcell Electroporation System	Bio-Rad
Peristaltische Pumpe Minipuls 2	Gilson
Stopped-flow-Apparatur Pi-Star 180	Applied Photophysics
Stopped-flow-Apparatur Scientific SF-61SX2	Hi-Tech
Pipetten 1-1000 µl	Gilson
Forma Orbital Shaker	Thermo
Scientific Gio Gyrotory Shaker	New Brunswick
Hybaid Px2 PCR-Maschine	Thermo
Phoenix Kristallisationsroboter	Art Robbins Instruments

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tissue Culture Dish 100 x 20 mm	Sarstedt
Dish 92 x 16 mm	Sarstedt

Nunclon Delta Surface 24-well-Platten	Nunc
Gene Pulser Cuvettes 0.4 cm	Bio-Rad
VIVASPIN Konzentratoren PES 4 ml 50000 Da	Vivascience
VIVASPIN Konzentratoren PES 20 ml 50000 Da	Vivascience
Visking Dialyseschlauch 36/32 Ø 27 mm	Serva
PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schnell
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad
500 ml Bottle Top Filter w/45 mm Neck, 22 µm PES	Corning Inc.
Minisart single use syringe filter 0.45 µm	Sartorius
Acrodish 13 mm Syringe Filter 0.2 µm Supor Membran	Pall Corporation
Spritzen Omnifex 10, 20 ml	Braun
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt
Protein Crystallography Plate 96 well	Corning Inc.

2.1.4 Medien und Nährböden für *E. coli*

Luria Bertani (LB)-Kulturmedium:

- 1 % (w/v) Pepton
- 1 % (w/v) Hefeextrakt
- 0.5 % (w/v) NaCl
- pH 7.0

LB-Amp-Agarplatten:

- LB-Kulturmedium
- 2% (w/v) Agar
- 75 µg/ml Ampicillin

SOB-Medium:

- 2.0 % (w/v) Bacto Trypton
- 0.5 % (w/v) Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄

2.1.5 Medien und Nährböden für *D. discoideum*

HL-5c-Medium:

- 10 g/l Proteose Peptone
- 5 g/l Bacto Yeast Extract
- 10 g/l Glucose
- 1.2 g/l KH₂PO₄
- 0.4 g/l Na₂HPO₄
- pH 6.6
- Penicillin/Streptomycin 2 µl/ml (frisch zusetzen)
- G418 Sulfat 10 µg/ml („G10“) (optional, frisch zusetzen)

MES-Agar: 20 mM MES pH 6.8
 0.2 mM CaCl₂
 2 mM MgCl₂
 2 % Agar Bacteriological

2.1.6 Organismen

E. coli XL1-Blue Stratagene

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)], Kompetenz: 2x10⁷ cfu/μg DNA

E. coli GM2163 Fermentas

Genotyp: F- ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136(StrR) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9(CamR) dcm-6 mcrB1 hsdR2(rk- mk+) *mcrA*, Kompetenz: 2x10⁷ cfu/μg DNA

Dictyostelium discoideum-AX3 ORF⁺ D. J. Manstein (MANSTEIN et al., 1989a)

2.1.7 Oligonukleotide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
MyoB-F394Yrev	5'-GAT TTC AAA ACC ATA AAT ATC TAA AAT ACC-3'
SZ19	5'-A GAA GCA TTT GGT AAT GC -3'
SZ21	5'-C ATT TGG TTT AAT ACA AC -3'
MyoE-Y395Frev	5'-CTC AAA ACC AAA GAT ATC AAG-3'
SZ25	5'-CCA AAT GGT GAA AGA ATT TC-3'
SZ01	5'-CGA TTG CAA ATG TGG ATT C-3'
MhcA S460Y rc	5'-GAC TTT GAA AAT TTC AAA ACC ATA GAT ATC CAA AAC ACC-3'
MhcA1150fw	5'- GTG CTG GTG AAG GTG CTG TCC-3'
1700anti	5'-TGG ATC TTT GTT CTT TTC TAA CC-3'
JEcoRIfw	5'-GGA TGT GCA CAA CCT GAT GAA TTG -3'
JY401Ffw	5'-GTA TTG GAC ATC TTT GGT TTT GAA TCG -3'
2R100rev	5'-GAA CAG ATT CGA TGG AAT C-3'
2RfwXhoI	5'-GGC CTC GAG CTA CCG-3'
2RrvBpu	5'-CCG CAA GCT CAG CTA A-3'
LZ1fw	5'-GCT GAG CTT GAA AGA CTC CAA GAT ATG AAG CAA CTT GAG G-3'
LZ2fw	5'-GAA GCA ACT TGA GGA TAA AGT AGA AGA ATT ATT ATC AAA GAA CTA TCA CC-3'
LZ3rv	5'-CAA TCT AGC AAC TTC ATT TTC AAG GTG ATA GTT CTT TG-3'
LZ4rv	5'-ATG CAT CAC CAA CTA ATT TCT TCA ATC TAG CAA CTT C-3'

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung von Plasmiden

Alle verwendeten Vektoren für die Proteinexpression in *D. discoideum* basieren auf dem von MANSTEIN et al. (1995b) entwickelten Vektor pDXA. Dieser enthält den starken konstitutiven Aktinpromotor *act15* mit einer darauf folgenden *multiple cloning site*, C- oder N-terminale Sequenzen für ein Affinitäts-tag (His- oder FLAG-tag) sowie das Resistenzgen für Geneticin zur Selektion positiver Transformanten. Neue Expressionsplasmide werden durch Ligation eines DNA-Inserts, z. B. ein DNA-Teil aus einem anderen Plasmid oder ein PCR-Fragment, mit einem Vektorplasmid hergestellt.

2.2.1.1 Gewinnung von Vektor und Insert – Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Gewinnung von Vektor- und Insert-DNA werden im einfachsten Fall Vektor- und Insert-Plasmid mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in folgendem Ansatz verdaut:

5 µg DNA
2 µl je Restriktionsenzym
5 µl 10x *Restriktionspuffer*
ad 50 µl H₂O steril.

Der Ansatz wird über Nacht bei der für die Restriktionsenzyme optimalen Temperatur inkubiert. Zur Gewinnung der gewünschten DNA-Abschnitte wird ein 0.8 %-iges TAE-Agarosegel angefertigt. Nach Zugabe von *DNA-Auftragspuffer* zu den Verdauansätzen wird das TAE-Agarosegel damit beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 110 V. Nach Färbung des Gels in 0.04 % EtBr für 10 min und anschließender Entfärbung in Wasser für weitere 10 min werden die DNA-Banden von Vektor und Insert unter UV-Licht ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (Qiagen) aufgereinigt. Erhalten werden so je 30 µl DNA in 10 mM Tris pH 8.5.

2.2.1.2 Ligation von Vektor und Insert

Die Ligation von Vektor und Insert wird in folgendem Ansatz durchgeführt:

30 ng Vektor-DNA
10-fach molarer Überschuss an Insert-DNA
1 µl 10x *T4 DNA-Ligasepuffer*
1 µl T4 DNA-Ligase (1 Weiss-U)
ad 10 µl H₂O steril.

Der Ansatz wird über Nacht bei 20 °C oder mehrere Tage bei 4 °C inkubiert und schließlich zur Transformation von *E. coli* (s. Kapitel 2.3.2) verwendet. Zur Religationskontrolle wird auch ein Ansatz ohne Insert-DNA mitgeführt.

TAE-Puffer:
40 mM Tris pH 8.0, 20 mM HOAc, 2 mM EDTA.

5x DNA-Auftragspuffer:
50 mM EDTA pH 8.0, 0.1 % (w/v) Bromphenol Blau, 25 % (w/v) Sucrose.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung des hergestellten Vektors wird eine Präparation im Mini-Maßstab durchgeführt. Dazu werden 3 ml LB-Amp-Medium mit einem *E. coli*-Klon, der das gewünschte Plasmid trägt, beimpft. Die Suspension wird über Nacht bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgt mithilfe eines DNA-Präparationskits (Qiagen) durch alkalische Extraktion mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung. Erhalten werden je 30 µl Plasmid-DNA in 10 mM Tris pH 8.5.

2.2.1.4 Restriktionsanalyse von klonierten Plasmiden – analytische Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die präparierten Plasmidlösungen das gewünschte Plasmid enthalten, wird ein selektiver Restriktionsverdau mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 3 µl DNA-Lösung
- 0.25 µl je Restriktionsenzym
- 2 µl 10x-Puffer
- ad 20 µl H₂O steril.

Der Ansatz wird für eine Stunde bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert, anschließend mit *DNA-Auftragspuffer* versetzt und mittels TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Darstellung von Plasmiden ist oft die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) notwendig. Sie dient der Herstellung und Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte *in vitro*, die schließlich für die Ligation mit dem entsprechenden Vektor verwendet werden können.

Für die PCR sind folgende Bestandteile notwendig:

- *Template*-DNA: diese DNA dient als Vorlage für die Vervielfältigung (z.B. genomische DNA, Plasmid-DNA etc.)
- Desoxyribonukleotide (dNTPs) als DNA-Bausteine
- Start- und End-Primer: einzelsträngige DNA-Abschnitte aus 15 oder mehr Basen, die komplementär zu der *Template*-DNA sind und an diese binden können (*annealing*). Ihr 3'-Ende dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Durch strategisches Entwerfen der Primer können die beiden Enden der synthetisierten DNA-Abschnitte Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsenzyme enthalten, die die Ligation in die gewünschten Vektoren erlauben. Des Weiteren können durch die Basenabfolge der Primer Änderungen in der Nukleotidsequenz der hergestellten DNA-Abschnitte erzeugt werden, die schließlich entsprechende Veränderungen (z. B. Punktmutationen) in der Proteinsequenz zur Folge haben. Die Schmelztemperatur der Primer, i.e. die Temperatur, bei der 50 % der Primer an den DNA-Einzelstrang gebunden sind, wird durch die Nukleotidzusammensetzung bestimmt.
- DNA-Polymerase: dieses Enzym liest einzelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung ab und synthetisiert dabei den komplementären 5'-3'-Strang durch Verknüpfung von dNTPs. Die verwendete

Polymerase verfügt über eine 3'-5'-*proofreading*-Aktivität, mit der sie die synthetisierte DNA überprüft und Fehler korrigiert.

Ein typischer PCR-Ansatz hat die folgende Zusammensetzung:

2 ng *Template*-DNA
 je 0.5 µl 0.1 mM Primer
 0.5 µl 10 mM dNTP-Mix
 5 µl 5x-*Puffer*
 0.5 U Polymerase
 ad 25 µl H₂O.

Die Bedingungen der PCR sind abhängig von der verwendeten *Template*-DNA, den Schmelztemperaturen der Primer und der verwendeten Polymerase. Prinzipiell jedoch besteht die PCR aus drei Abschnitten. Nach anfänglicher Denaturierung der *Template*-DNA binden die beiden Primer an die DNA-Einzelstränge und die Polymerase kann den folgenden DNA-Abschnitt synthetisieren (Elongation). Danach beginnt der Zyklus von vorne. Eine Übersicht über die Bedingungen der einzelnen Schritte bietet Tabelle 2.

Tab. 2: Ablauf einer typischen Polymerase-Kettenreaktion

Abschnitt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Wiederholung
Einleitende Denaturierung	Trennung der <i>Template</i> -DNA-Stränge	95	180	1x
Denaturierung	Trennung der <i>Template</i> -DNA-Stränge	95	30	28-33x
<i>Annealing</i>	Anlagerung der Primer	40 – 70	60	
Elongation	Verlängerung der Primer	72 (Polymerase-spezifisch)	15/1000 bp	
Abschließende Elongation	Verlängerung nicht fertiggestellter DNA-Abschnitte	72	600	1x
Lagerung	Lagerung der hergestellten DNA	4	∞	

2.2.3 pGEM-TEasy-Klonierung und *Blue-White-Screening*

Um mit der PCR-Methode hergestellte DNA-Fragmente amplifizieren und sequenzieren zu können, wird das PCR-Produkt mit dem linear vorliegenden pGEM-TEasy-Vektor (Promega) ligiert. Der Vektor ist mit dem Enzym *Topoisomerase I* verknüpft, das die Ligation erleichtert. Das Einfügen des PCR-Inserts in den Vektor führt zur Unterbrechung des auf dem Vektor liegenden lacZ-Gens, das Bakterien die Expression von β-Galaktosidase erlaubt. Somit können leere, religierte pGEM-Vektoren von Vektoren mit Insert unterschieden werden, wenn die transformierten Bakterien mit 20 mg/ml X-Gal und 200 mg/ml IPTG ausgestrichen werden. IPTG induziert die Expression der β-Galaktosidase, die X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Bakterien, die den religierten Vektor enthalten, bilden somit blaue Kolonien, während Klone, die einen pGEM-Vektor mit Insert enthalten, weiß bleiben.

2.2.4 Synthese der Expressionsvektoren

2.2.4.1 Expressionsvektoren zur Produktion von Myosinkonstrukten mit Mutationen in Schalter-2

Um eine spezifische Punktmutation in die für Schalter-2 codierende Sequenz der Myosine *DdMyosin-1B*, *DdMyosin-1E*-, *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5b* einzuführen, müssen die entsprechenden Expressionsvektoren über eine zweistufige PCR generiert werden. Dazu kann auf bereits bestehende Vektoren als *Template* zurückgegriffen werden (TSIAVALIARIS et al., 2008; DÜRRWANG et al., 2006; MANSTEIN et al., 1995; TAFT et al., 2008). Diese codieren für die jeweilige Myosinmotordomäne („MD“; *DdMyosin-1B*: AS 1 - 698, *DdMyosin-1E*: AS1 - 698, *DdMyosin-2*: AS 1 - 765, *DdMyosin-5b*: AS 1 - 839) sowie den künstlichen C-terminalen Hebelarm „2R“, bestehend aus zwei rigiden α -Aktinin-Einheiten aus *D. discoideum* (ANSON et al., 1996). Der C-Terminus des Hebelarms endet mit einem (His)₇-tag für die Aufreinigung der Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Für amöboide Klasse-I Myosine ist bekannt, dass diese durch Phosphorylierung an der sogenannten TEDS-Stelle der Motordomäne reguliert werden (BEMENT und Mooseker, 1995; BRZESKA und Korn, 1996). Die negative Ladung des Phosphatrests erhöht die Wechselwirkung der CM-Schleife mit F-Aktin, es kommt zu einer Beschleunigung der Aktin-aktivierten ATP-Umsetzung. Eine permanente Aktivierung ist durch die Mutation der TEDS-Stelle zu Glutamat möglich. In den als *Template* dienenden Expressionsvektoren für Myosin-1B-2R und Myosin-1E-2R liegt die entsprechende Mutation bereits vor. Die Einführung der Mutation in die für Schalter-2 codierende DNA-Sequenz wird, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, durchgeführt, die Primer sind in Kapitel 2.1.7 aufgelistet. Einen Überblick über die hergestellten Vektoren zur Expression von Myosinkonstrukten mit Mutationen in Schalter-2, die Proteine, für die sie codieren sowie ihre in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bezeichnungen gibt Tabelle 3.

Tab. 3: Expressionsvektoren, exprimierte Myosinkonstrukte und ihre in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bezeichnungen

Vektor	Exprimiertes Protein	Verwendeter Proteinname
pM-1B-S332E-F387Y-2R	<i>DdMyosin-1B</i> -MD-S332E-F387Y-2R	Myosin-1B-F387Y
pM-1E-S336E-Y388F-2R	<i>DdMyosin-1E</i> -MD-S336E-Y388F-2R	Myosin-1E-Y388F
pM-5b-Y487F-2R	<i>DdMyosin-5b</i> -MD-Y487F-2R	Myosin-5b-Y487F
pM765-S456Y-2R	<i>DdMyosin-2</i> -MD-S456Y-2R	Myosin-2-S456Y

2.2.4.2 Expressionsvektor zur Produktion des *in silico* entworfenen Myosins Myosin-5b-2R-LZ-EYFP

Als Ausgangsvektor für die Generierung des Expressionsvektors pM5b-2R-LZ-EYFP-FLAG dient das Plasmid pM5b-FLAG, das für die Motordomäne von *DdMyosin-5b* mit C-terminalem FLAG-tag codiert. Zwei DNA-Fragmente, die für den artifiziellen Hebelarm „2R“ bzw. den Leucin-Zipper GCN4 (O'SHEA et al., 1991) codieren, werden mittels PCR hergestellt. Als *Template* für die DNA-Sequenz des Hebelarms wird das Plasmid pM765-2R (ANSON et al., 1996), als Primer 2RfwXho sowie 2RrvBpu verwendet. 2RfwXho enthält die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *XhoI*. Mithilfe des *reverse*-Primers 2RrvBpu wird die Mutation K999E sowie eine C-terminale Schnittstelle für das

Restriktionsenzym *Bpu1102I* durch Einführung einer stillen Punktmutation erzeugt. Das so hergestellte PCR-Produkt wird zur Amplifikation in einen pGEM-Vektor zu pGEM-2R kloniert.

Der 121 Basenpaare lange DNA-Abschnitt, der für den Leucin-Zipper codiert, wird vollständig aus vier synthetischen Oligonukleotiden hergestellt. In wenigen PCR-Zyklen werden die Primer LZ2fw und LZ3rev, welche in einem überlappenden Bereich hybridisieren, zu einem Doppelstrang vervollständigt und vervielfältigt. Das so generierte *Template* wird mithilfe der beiden Primer LZ1fw und LZ4rev amplifiziert. Dabei wird das DNA-Fragment durch die überhängenden Enden der beiden Primer verlängert und schließlich der so entstandene DNA-Doppelstrang in den folgenden 30 Zyklen vervielfältigt. LZ1fw und LZ4rev enthalten die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bpu1102I* bzw. *NsiI*, sodass der für den Leucin-Zipper codierende DNA-Abschnitt unter Verwendung dieser beiden Restriktionsenzyme in den oben beschriebenen pGEM-2R-Vektor integriert werden kann. Der so entstandene DNA-Abschnitt 2R-LZ wird mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NsiI* ausgeschnitten und in das Plasmid pM5b-FLAG eingefügt.

Der für EYFP codierende DNA-Abschnitt kann aus dem Plasmid pM5b-3R-EYFP durch den Restriktionsverdau mit *NsiI* gewonnen und mit dem entsprechend linearisierten Plasmid pM5b-2R-LZ-FLAG zum Expressionsvektor pM5b-2R-LZ-EYFP-FLAG ligiert werden.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen werden 5 ml SOB-Medium mit *E. coli* beimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C geschüttelt. Nach 16 h werden 200 ml SOB-Medium mit 1 ml der Vorkultur beimpft und bei 225 rpm und 20 °C geschüttelt, bis eine optische Dichte von $OD_{600} = 0.6$ erreicht wird. Der Kolben wird für 10 min auf Eis gekühlt, die Suspension zu je 100 ml in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und schließlich bei 2300 rpm (Beckman JS-4.2) und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die beiden Pellets werden in 33 ml eiskaltem *TB-Puffer* resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 1500 rpm (Beckman JS-4.2) und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Jedes Pellet wird in 6 ml eiskaltem *TB-Puffer* mit 7 % (v/v; Volumen/Volumen) DMSO resuspendiert. Die Suspension wird in 100 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer:

250 mM KCl, 10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂ (steril filtriert, Zugabe von MnCl₂ erfolgt direkt vor Gebrauch).

2.3.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA werden 100 µl bei -80 °C gelagerte, chemisch kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA (Präparation oder Ligationsansatz) versetzt. Die Suspension wird auf Eis für 30 Minuten unter gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock durch Überführung in 42 °C für 60 Sekunden. Anschließend wird die Suspension für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden auf einer (bei Bedarf Ampicillin-haltigen) LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum-Zellen werden entweder in Gewebekultur-Petrischalen oder in Schüttelkulturen (180 rpm) bei 20 °C kultiviert. Als Kulturmedium dient für AX3-ORF⁺-Zellen HL5c-Medium. Um auf transfizierte Zellen Selektionsdruck auszuüben, wird dem Medium das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 10 µg/ml („G10“) zugesetzt.

2.4.2 Transfektion von *D. discoideum*

Für die Transfektion von *D. discoideum* werden 50 ml HL-5c-Medium mit AX3-ORF⁺-Zellen beimpft und bei 180 rpm geschüttelt. Bei einer Zelldichte von $2 - 3 \cdot 10^6$ Zellen/ml wird die Suspension bei 2800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden zwei Mal mit je 20 ml *Elektroporationspuffer* gewaschen und schließlich im gleichen Puffer zu $8-10 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. 0.8 ml dieser Zellsuspension werden mit 15 bis 30 µg Plasmid-DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0.4 mm Schichtdicke überführt, die anschließend für weitere 5 Minuten auf Eis gekühlt wird. Die Elektroporation erfolgt mittels zweier Pulse (1200 V, 3 µF, 600 Ω, 5 s Pause) mit einer Zeitkonstante von 1 ms. Die Küvette wird erneut auf Eis gekühlt. Nach fünf Minuten wird die Zellsuspension auf drei Petrischalen zu 100, 300 und 500 µl pipettiert und mit 11 ml HL-5c-Medium versetzt. Zur Selektion transfizierter Zellen wird das Medium nach 24 h gewechselt und mit 10 µg/ml G418 versetzt.

Elektroporationspuffer:

10 mM KP_i -Puffer pH 6.1, 50 mM Sucrose.

2.4.3 Konservierung von *D. discoideum* in Form von Sporen

Eine Lagerung von *D. discoideum* Zelllinien ist in Form von Sporen für mehrere Jahre bei – 80 °C möglich. Für die Erzeugung von Sporen werden 100 ml Zellsuspension mit einer Dichte von etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml für zwei Minuten bei 2800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wird durch zweimaliges Pelletieren und Resuspendieren in 20 ml *MES-Puffer* gewaschen. Schließlich werden die Zellen in 600 µl *MES-Puffer* resuspendiert und auf zwei MES-Agarplatten gleichmäßig ausgestrichen. Die Platten werden zunächst ohne Deckel getrocknet und anschließend über Kopf für 48 Stunden inkubiert. Durch einmaliges Aufklopfen der Petrischale werden die gebildeten Sporen auf den Deckel übertragen und in 1 ml 10 % (w/v; Gewicht/Volumen) sterilem Glycerin resuspendiert. Die Sporensuspension wird in 100 µl-Portionen bei –80 °C gelagert.

Um die Sporen zum Keimen zu bringen, werden 100 µl Sporensuspension auf eine Petrischale überführt und die Platte mit 11 ml HL-5c-Medium versetzt. Bei transfizierten Zelllinien werden nach 24 Stunden 10 µg/ml G418 zugefügt.

MES-Puffer:

20 mM MES pH 6.8, 0.2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Analytische Präparation von rekombinanten Myosinkonstrukten aus *D. discoideum*

Die Expression rekombinanter Myosinkonstrukte in transfizierten *D. discoideum*-Zellen kann mithilfe einer analytischen Myosinpräparation untersucht werden. Dazu werden ca. $3 \cdot 10^7$ Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 3500 rpm pelletiert, mit 1 ml *Lysispuffer 1* gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wird in 500 µl *Lysispuffer 2* resuspendiert. Es erfolgt die Zugabe des gleichen Volumens *Lysispuffer 3* und eine einstündige Inkubation auf Eis. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit *Lysispuffer 1* gewaschen und erneut für 25 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstands wird das im Pellet enthaltene Myosin durch Zugabe von 40 µl *Lysispuffer 4* unter Verwendung eines Mikropistills extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm befindet sich Myosin im Überstand. Dieser wird abgenommen, mit *6x-Protein-Auftragspuffer* versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Von der Proteinlösung werden 10 µl für die Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.5.5) verwendet. Als Vergleich dient eine analytische Myosinpräparation aus *DdAX3-ORF*⁺.

Lysispuffer 1:

50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, Protease-Inhibitor Mix I (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix II (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer 2:

Lysispuffer 1, 1 U CIAP/Probe (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer 3:

Lysispuffer 1, 1 % v/v Triton-X 100.

Lysispuffer 4:

Lysispuffer 1, 12 mM MgCl₂, 10 mM ATP (frisch hinzugefügt).

100x Protease-Inhibitor Mix I:

10 mg/ml TAME, 8 mg/ml TPCK, 0.2 mg/ml Pepstatin A, 0.5 mg/ml Leupeptin, in Ethanol abs.

1000x Protease-Inhibitor Mix II:

100 mM PMSF, in Ethanol abs.

2.5.2 Präparative Aufreinigung von rekombinanten Myosinkonstrukten aus *D. discoideum*

Die präparative Aufreinigung von rekombinanten Myosinkonstrukten verfährt nach dem selben Prinzip wie die analytische Präparation und unterscheidet sich von dieser nur in der Zellmenge sowie durch die Affinitätschromatographie nach der Extraktion des Myosins (MANSTEIN und Hunt, 1995). Die chromatographische Aufreinigung wird mit einer FPLC-Anlage betrieben, die eine relative Bestimmung des Proteingehalts des fraktionierten Eluats durch Messung der Tryptophan-Absorption bei 280 nm erlaubt.

12-16 l Schüttelkultur der exprimierenden *D. discoideum*-Zellen werden bei einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml geerntet. Die gesamte Präparation findet auf Eis bzw. bei 4°C statt. Die Zellen werden für 5 Minuten bei 4200 rpm (Rotor JS-4.2) pelletiert, mit 0.5 l *PBS-Puffer* gewaschen und erneut pelletiert. Das Nassgewicht des Pellets wird für die Ermittlung der Puffervolumina bestimmt, in

der Regel beträgt es zwischen 30 und 80 g. Die Zellen werden in 4 bis 8 ml/g Zellen *Lysispuffer I* gründlich resuspendiert. Diese Suspension wird für eine Minute mit Ultraschall behandelt (3/4 Füllhöhe, 50 % *Power Setting*, 40 % *Duty Cycle*). Nach Zugabe des gleichen Volumens an *Lysispuffer II* wird die Suspension zur weiteren Zellyse für 30 bis 45 Minuten unter leichtem Rühren bei 4°C inkubiert. Nach einstündiger Zentrifugation bei 42000 rpm (Rotor 45Ti) wird der Überstand verworfen und die Pellets in insgesamt 100 ml *Waschpuffer* resuspendiert. Die erneute Pelletierung erfolgt bei 41000 rpm (Rotor 45Ti) für 45 Minuten. Die Pellets werden in 2 ml/g Zellen (mindestens 75 ml) *Extraktionspuffer* sorgfältig homogenisiert. Es folgt eine einstündige Zentrifugation bei 60000 rpm (Rotor 70Ti). Schließlich wird der Überstand durch einen Filter mit der Porengröße 0.45 µm steril filtriert. Zur Analyse des Aufreinigungsprozesses wird von jeder Fraktion eine Probe genommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.5.5) untersucht. Die weitere Reinigung des extrahierten Myosins erfolgt, entsprechend des *Affinitäts-tags*, mittels NiNTA-Affinitätschromatographie oder α-FLAG-Affinitätschromatographie.

NiNTA-Affinitätschromatographie: Rekombinante Myosinkonstrukte mit (His)₇-Affinitäts-tag werden mittels NiNTA-Säule (Nickel-Nitriltriacetat, Qiagen) aufgereinigt. Diese wird mit einem Säulenvolumen *NiNTA Imidazol-Puffer*, einem Säulenvolumen *NiNTA Hochsalz-Puffer* und 10 Säulenvolumina *NiNTA Niedrigsalz-Puffer* äquilibriert. Der steril filtrierte Überstand wird mithilfe einer peristaltischen Pumpe auf die Säule aufgetragen (1.5 ml/min Flussrate). Im Anschluss wird die Säule mit jeweils 3 Säulenvolumina *NiNTA Niedrigsalz-Puffer*, *NiNTA Hochsalz-Puffer* und 3 % *NiNTA Imidazol-Puffer* in *NiNTA Niedrigsalz-Puffer* gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt durch einen Gradienten von 3 bis 100 % *NiNTA Imidazol-Puffer*, welcher dem *NiNTA Niedrigsalz-Puffer* zugesetzt wird, über 6 Säulenvolumina (2 ml/min Flussrate). Es werden 1.5 ml-Fraktionen gesammelt. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird der Myosingehalt der Fraktionen analysiert. Abb. 10 zeigt als Beispiel das SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen der NiNTA-Affinitätschromatographie von Myosin-1E-Y388F. Die ausgewählten Fraktionen werden vereinigt und über Nacht gegen 2 l *Lager-Puffer* dialysiert.

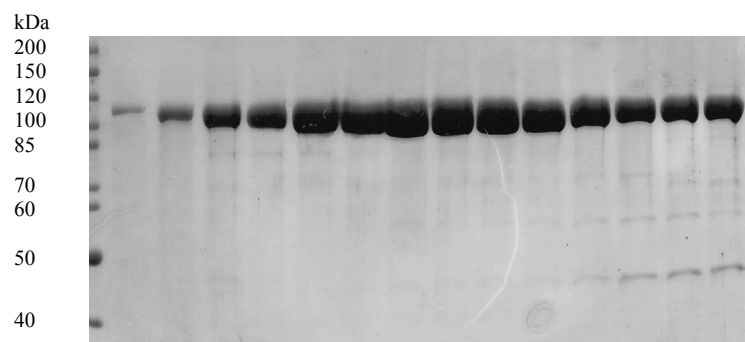


Abb. 10: SDS-Polyacrylamid-Gel der NiNTA-Affinitätschromatographie von Myosin-1E-Y388F. Zu sehen ist der Proteinmarker (links) sowie Proben gesammelter Fraktionen.

α-FLAG-Affinitätschromatographie: Bei rekombinanten Myosinkonstrukten mit FLAG-Affinitäts-tag wird der Myosin-haltige Extraktionsüberstand auf eine α-FLAG-Säule (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma Aldrich), die zuvor mit einem Säulenvolumen *TBS-Puffer*, 3 Säulenvolumina 0.1 M *Glycin/HCl* pH 3.5 und weiteren 5 Säulenvolumina *TBS-Puffer* äquilibriert worden ist, mittels

peristaltischer Pumpe aufgetragen (1 ml/min Flussrate). Nach Waschen mit 15 Säulenvolumina *FLAG-Waschpuffer* wird das Protein mit 5 Säulenvolumina *FLAG-Elutionspuffer* eluiert und in 5 ml-Fractionen gesammelt. Diese werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die ausgewählten Fractionen werden gegen 2 l *Lager-Puffer* über Nacht dialysiert. In Abb. 11 ist beispielhaft das SDS-Polyacrylamidgel der α -FLAG-Affinitätschromatographie von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP dargestellt.

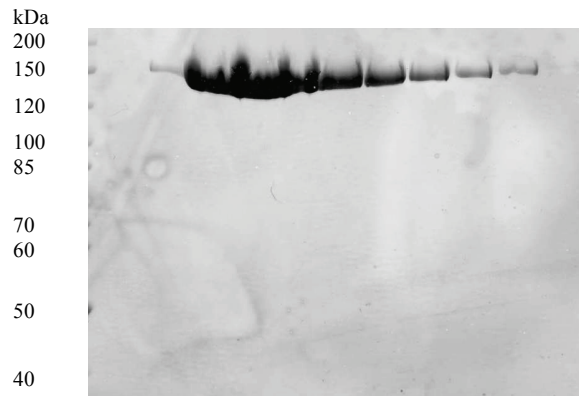


Abb. 11: SDS-Polyacrylamid-Gel der α -FLAG-Affinitätschromatographie von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP. Zu sehen ist der Proteinmarker (links) sowie Proben der aufgefundenen Fractionen.

Nach beendeter chromatographischer Aufreinigung wird die Proteinlösung mit *Vivaspin*-Konzentratoren (M_w cut-off = 50 kDa, Vivascience AG) einkonzentriert. Für kinetische Untersuchungen wird die Lösung auf eine Konzentration von 2 bis 4 mg/ml eingestellt. Die Lösung wird in PCR-Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

PBS-Puffer:

10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.4, 150 mM NaCl.

Lysispuffer I:

50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 40 $\mu\text{g/ml}$ TLCK (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix I (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix II (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer II:

Lysispuffer I, 1 % v/v Triton-X 100, 15 $\mu\text{g/ml}$ Ribonuklease A (frisch hinzugefügt), 100 U CIAP abs. (frisch hinzugefügt).

Waschpuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 15 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 7 mM β -ME (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Extraktionspuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 15 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0 – 300 mM KCl, 7 mM β -ME (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 15 mM ATP (frisch hinzugefügt).

NiNTA Niedrigsalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Hochsalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 300 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Imidazol-Puffer:

1 M Imidazol pH 7.3, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

TBS-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl.

FLAG-Waschpuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 150 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

FLAG-Elutionspuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 150 mM KOAc, 100-200 µg/ml FLAG Peptid (frisch hinzugefügt), 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Lager-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 1 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Die Aufreinigung des rekombinanten Myosinkonstrukts *NtMyosin-11-2R* folgt der oben beschriebenen Durchführung. Wie auch für andere Klasse-11 Myosine in der Literatur beschrieben (KASHIYAMA et al., 2001; HACHIKUBO et al., 2007), ist *NtMyosin-11-2R* nur in nukleotidgebundener Form stabil. Daher wird allen Puffern, die der Extraktion folgen, 2mM ATP zugefügt. Zur zusätzlichen Stabilisierung des Proteins enthalten alle Puffer 3 % (w/v) Trehalose. Folgende Puffer unterscheiden sich außerdem von den oben genannten:

Lysispuffer I:

30 mM HEPES pH 8.0, 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 3 % (w/v) Trehalose, 10 mM DTT (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 40 µg/ml TLCK (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix I (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix II (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer II:

Lysispuffer I, 1 % v/v Triton-X 100, 15 µg/ml Ribonuklease A (frisch hinzugefügt), 100 U CIAP abs. (frisch hinzugefügt).

Waschpuffer:

30 mM HEPES pH 8.0, 50 mM KCl, 3 % (w/v) Trehalose, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 1 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Niedrigsalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 2 mM ATP (frisch hinzugefügt), 4 mM MgCl₂, 3 % (w/v) Trehalose, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Hochsalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 300 mM KOAc, 2 mM ATP (frisch hinzugefügt), 4 mM MgCl₂, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 3 % (w/v) Trehalose.

NiNTA Imidazol-Puffer:

1 M Imidazol pH 7.3, 2 mM ATP (frisch hinzugefügt), 4 mM MgCl₂, 3 % (w/v) Trehalose, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Lager-Puffer:

25 mM HEPES pH 7.4, 300 mM KCl, 2 mM ATP (frisch hinzugefügt), 4 mM MgCl₂, 10 % (w/v) Trehalose, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 1 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Für den Abbau des in der Proteinlösung enthaltenen ADP vor der Durchführung kinetischer Experimente werden der Lösung 1U Apyrase/50 µl Proteinlösung zugesetzt und die Lösung für

16 Stunden auf Eis inkubiert. Diese Menge an Apyrase setzt bei pH 6.5 und 30 °C 1 $\mu\text{mol P}_i$ pro Minute frei.

2.5.3 Gewinnung von Aktin aus Kaninchenmuskel

2.5.3.1 Präparation von Aktin in Form von Aceton-Pulver

Das für kinetische Experimente benötigte Aktin wird aus dem Muskelfleisch von Neuseeland-Kaninchen gewonnen. Ein großer Anteil des Fleisches besteht aus Aktin und Myosin-2. Die Methode der Aufreinigung basiert auf dem unterschiedlichen Verhalten der beiden Proteine bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Während Aktin bei hohen Salzkonzentrationen als filamentöses F-Aktin vorliegt, präzipitiert Myosin-2 bei geringeren Salzkonzentrationen (SPUDICH und Watts, 1971).

Die gesamte Aufreinigung findet bei 4 °C statt, alle Puffer werden vorgekühlt. Das Muskelfleisch von Rücken und Beinen eines frisch geschlachteten jungen Neuseeland-Kaninchens wird für 30 min auf Eis gekühlt. Nach Entfernung der Sehnen wird das Fleisch für die Berechnung der benötigten Puffervolumina gewogen und mittels Fleischwolf zerkleinert. Die Masse wird im dreifachen Gewichtsvolumen *Guba-Straub-Puffer* zur Extraktion des Aktins langsam gerührt. Nach Zugabe von 12 Gewichtsvolumina H_2O unter heftigem Rühren wird die Suspension durch ein Mulltuch filtriert. Der Aktin-haltige Rückstand wird in *Carbonatpuffer A* resuspendiert und für weitere 30 min gerührt. Der durch erneutes Filtrieren gewonnene Rückstand wird in 1 l *Carbonatpuffer B* resuspendiert und nach 10 min Rühren mit 10 l 20 °C warmen H_2O verdünnt. Nach erneutem Filtrieren wird der Rückstand in 2.5 l Aceton gerührt, abfiltriert und in weiteren 2.5 l Aceton gerührt. Schließlich wird der abfiltrierte Rückstand für einen Tag unter der Sterilwerkbank gelagert, um das vollständige Abdampfen des Acetons zu gewährleisten. Das so gewonnene Acetonpulver wird gesiebt und schließlich bei -20 °C gelagert.

Guba-Straub-Puffer:

0.1 M KH_2PO_4 pH 6.6, 0.05 M K_2HPO_4 , 0.3 M KCl.

Carbonatpuffer A:

4 % (w/v) NaHCO_3 , 0.1 mM CaCl_2 .

Carbonatpuffer B:

10 mM NaHCO_3 , 10 mM Na_2CO_3 , 0.1 mM CaCl_2 .

2.5.3.2 Präparation von F-Aktin aus Acetonpulver

Das Polymerisationsverhalten von Aktin ist unter anderem stark abhängig von der Ionenstärke. Zur Gewinnung von reinem Aktin aus Acetonpulver wird diese Eigenschaft ausgenutzt. Die Aufreinigung basiert auf mehrmaligem Polymerisieren zu F-Aktin und Depolymerisieren zu G-Aktin (LEHRER und Kerwar, 1972).

5g Acetonpulver werden mit 120 ml kaltem *Aktinpuffer* versetzt. Zur Extraktion des G-Aktins wird die Suspension für 30 min bei 4 °C gerührt und schließlich mittels Vakuumpumpe filtriert. Durch Zentrifugation der filtrierten Lösung bei 70000 g und 4 °C für eine Stunde werden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Die Polymerisation des im Überstand enthaltenen Aktins erfolgt bei Raumtemperatur durch Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl_2 . Das nun vorliegende F-Aktin wird

durch 3-stündige Zentrifugation bei 70000 g und 4 °C pelletiert und nach Entfernung des Überstands in 50 – 100 ml *Depolymerisationspuffer* mittels eines Glashomogenisators homogenisiert. Vollständige Entfernung des Salzes und damit die Depolymerisation des F-Aktins wird durch Dialyse gegen 5 l *Depolymerisationspuffer* über Nacht bei 4 °C erreicht. Nach erneuter Zentrifugation bei 70000 g und 4 °C für eine Stunde besteht der Überstand aus reinem G-Aktin. Schließlich werden der Proteinelösung zur Gewinnung von F-Aktin erneut 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ zugefügt und die Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder, zur Gewinnung von längeren Filamenten, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Erneute Pelletierung für eine Stunde bei 70000 g und 4 °C sowie Homogenisierung des F-Aktins in *Aktin-Resuspensionspuffer* führt zu der in den verschiedenen Experimenten eingesetzten F-Aktin-Lösung, deren finale Konzentration durch photometrische Messung bestimmt wurde (s. Kapitel 2.5.6.1; $\epsilon_{\text{Aktin}} = 46000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; $M_{\text{W}}(\text{Aktin}) = 41700 \text{ Da}$).

Aktinpuffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,2 mM CaCl₂, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 0,5 mM ATP (frisch hinzugefügt).

Depolymerisationspuffer:

5 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, 0,1 mM ATP (frisch hinzugefügt).

Aktin-Resuspensionspuffer:

5 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,04 % NaN₃.

2.5.4 Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin

Die Bestimmung verschiedener transientenkinetischer Parameter der Myosin-Aktin-Interaktion erfordert die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Aktin. Dieses wird durch die spezifische Reaktion von N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (s. Abb. 12) mit der SH-Gruppe von Cys374 von Aktin gewonnen.

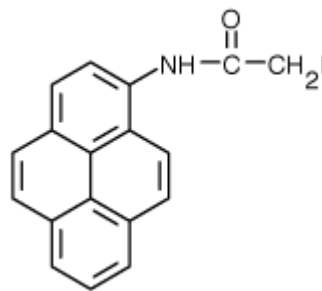


Abb. 12: Molekulare Struktur von N-(1-pyrenyl)iodoacetamid

Hierzu wird, entsprechend der Methode von CRIDDLE et al. (1985), eine etwa 1 mg/ml konzentrierte F-Aktin-Lösung mit 5 mg/ml N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (Pyren) in DMSO in einem Verhältnis von 0,9 % (v/v) Pyren/Aktin unter vorsichtigem Rühren langsam gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für 14 Stunden im Dunkeln gerührt. Die Aufreinigung des Pyren-markierten Aktins erfolgt durch einstündige Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C. Das im Überstand enthaltene Pyren-Aktin wird für 3 h bei 70000 g und 4 °C pelletiert und in *Aktin-Resuspensionspuffer* homogenisiert.

Die Bestimmung der Aktin-Konzentration sowie des Anteils an Pyren-markiertem Aktin ist durch Extinktionsmessung bei 280 nm möglich (s. Kapitel 2.5.6.1). Dabei muss jedoch die Absorption von Pyren bei 280 nm berücksichtigt werden (KOUYAMA und Mihashi, 1996). Die Pyren-Konzentration

kann mithilfe des Absorptionsmaximums von Pyren bei 344 nm ($\epsilon_{344} = 23300 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) bestimmt werden. Daraufhin kann die Pyren-Absorption bei 280 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Pyren bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 22000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) berechnet und von der Gesamtabsorption subtrahiert werden. Der Markierungsgrad liegt in der Regel zwischen 60 und 85 %.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.5.5.1 SDS-Polyacrylamidgele

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach LAEMMLI (1970) werden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus 10 %-igem Trenn- und 5 %-igem Sammelgel mit einer Dicke von 0.75 mm bestehen (diskontinuierliche Gelelektrophorese). Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
40 % Acrylamid	1.25 ml	95 μl
1.5 M Tris/HCl pH8.8	1.4 ml	-
1 M Tris/HCl-Puffer pH 6.8	-	95 μl
1 % SDS	0.5 ml	75 μl
H ₂ O	1.85 ml	480 μl
40 % APS	15 μl	2.5 μl
TEMED	15 μl	2.5 μl

Die Proben werden vor dem Auftragen mit *6x-Proteinauflaufspuffer* versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in einer Minigelkammer bei 35 mA Stromstärke je eingespanntem Gel für ca. 60 min. Das Gel wird im Anschluss entweder für Western-Blots verwendet oder durch Erhitzen in *Coomassie Blue-Färbelösung* angefärbt und in 6 % Essigsäure wieder entfärbt. Proteinhaltige Stellen werden als blaue Banden sichtbar.

6x-Proteinauflaufspuffer:

350 mM Tris pH 6.8, 30 % Glycerin, 600 mM DTT, 10 % SDS, 0.01 % Bromphenol Blau.

10x-Laemmli-Puffer:

30.2 g Tris, 142.6 g Glycin, 1 % SDS.

Coomassie Blue-Färbelösung:

2 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 426 ml Ethanol 96 %, 50 ml Methanol 100 %, 100 ml Essigsäure 100 %, ad 1 l H₂O.

2.5.5.2 Western-Blot

Zur Detektion rekombinanter Proteine werden Western-Blots nach dem Verfahren des *Semi-Dry Blot* angewandt. Dazu wird das Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese mit zwei dicken Filterpapieren sowie eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran) in Größe des Gels für 5 Minuten in *Blotpuffer* gelegt. Auf das Blotgerät wird, entsprechend der Anordnung der Elektroden, ein Filterpapier, darauf die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und schließlich das zweite Filterpapier gelegt. Nach dem Schließen der Kammer werden 14 V Spannung für 45 min angelegt. Im

Anschluss wird die Membran mit einer Lösung aus 2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA gefärbt, um die Effektivität des Protein-Transfers zu überprüfen. Zur anschließenden Entfärbung der Membran wird destilliertes Wasser verwendet.

Die Membran wird nun für eine halbe Stunde in *TBST-Puffer* mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Der Milchlösung wird der primäre Antikörper in der benötigten Konzentration zugesetzt. Die Inkubation der Membran in der Antikörperlösung erfolgt unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach 3x10 min Waschen mit *TBST-Puffer* wird die Membran in *TBST-Puffer* mit 5 % (w/v) Magermilchpulver und dem Sekundär-Antikörper für 40 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgen drei weitere Waschschritte zu je 10 min mit *TBST-Puffer*. Der Sekundärantikörper ist mit Peroxidase aus Meerrettich (*horseradish peroxidase*, HPR) konjugiert, die mittels einer Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung eines Kits von PIERCE (Super Signal Dura West Extended Duration Substrate) nachgewiesen werden kann.

Blotpuffer:

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.03 % SDS.

TBST-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05 % v/v Tween-20.

2.5.6 Photometrische Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung

2.5.6.1 UV₂₈₀-Messung

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption; ε : Extinktionskoeffizient, c:Konzentration, d: Schichtdicke

ermittelt werden. Die Absorption beruht im Wesentlichen auf den Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin, der Extinktionskoeffizient ε_{280} kann daher aus der Aminosäurezusammensetzung des Proteins mithilfe des Programms SEDNTERP berechnet werden. Da auch Pufferbestandteile zu der Absorption bei 280 nm beitragen können, wird ein Leerwert des gleichen Puffers bestimmt und von der gemessenen Absorption der Proteinlösung abgezogen.

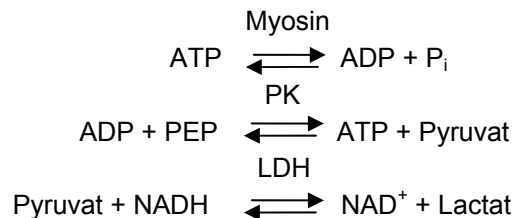
2.5.6.2 Photometrische Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die photometrische Bestimmung des Proteingehalts nach BRADFORD (1976) wird durch die Bildung eines tiefblaugefärbten Komplexes der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm ermöglicht. Dazu werden 950 μ l Bradford-Reagenz mit 50 μ l proteinhaltiger Lösung gemischt. Nach einer 6-minütigen Inkubation hat sich der Komplex vollständig ausgebildet und die Absorption bei 595 nm wird photometrisch gemessen. Durch Erstellen einer Eichgerade mit einer Proteinlösung bekannter Konzentration kann die Proteinkonzentration der vermessenen Lösung berechnet werden.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 *Steady state*-Kinetik

Myosin setzt in einer enzymatischen Reaktion ATP zu ADP und P_i um. Viele enzymatische Reaktionen können durch direkte photometrische Beobachtung der Edukt-Umwandlung kinetisch charakterisiert werden, da Edukt und Produkt unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften aufweisen. Das Absorptionsverhalten von ATP und ADP unterscheidet sich jedoch nicht, daher erfolgt die Messung der ATP-Umsetzung im Fließgleichgewicht (*steady state*) mithilfe eines gekoppelten Enzymtests (TRENTHAM et al., 1972; FURCH et al., 1998). Das von Myosin produzierte ADP wird von Pyruvatkinase, unter Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat, wieder zu ATP umgewandelt. Lactat-Dehydrogenase (LDH) setzt wiederum das entstandene Pyruvat zu Lactat um. Dabei wird NADH zu NAD^+ zu oxidiert. Diese Reaktion kann photometrisch durch Messung der NADH-Absorption bei 340 nm ($\epsilon_{NADH} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt werden.



Das Reaktionsgemisch hat die folgende Zusammensetzung:

0.2 mM NADH
 0.5 mM PEP
 0.02 mg/ml LDH
 0.05 mg/ml PK
 1 mM ATP
 0-80 μM F-Aktin
 0.1-1 μM Myosin
 in *ATPase-Puffer*.

Da bei den eingesetzten Enzymkonzentrationen alle, der ATP-Hydrolyse folgenden, Reaktionen deutlich schneller ablaufen, stellt die Umsetzung von ATP zu ADP durch Myosin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die Geschwindigkeit der Umsetzung von NADH zu NAD^+ entspricht somit der Myosin-Umsatzgeschwindigkeit.

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann aus der Konzentrationsänderung von NADH die Geschwindigkeitskonstante der Umsetzung von ATP zu ADP durch Myosin (k_{ATPase}) berechnet werden:

$$\begin{aligned}
 \Delta A &= \epsilon_{\text{NADH}}(340 \text{ nm}) \cdot \Delta[\text{NADH}] \cdot d \\
 k_{\text{ATPase}} &= \frac{-\Delta A}{60 \cdot \epsilon_{\text{NADH}}(340 \text{ nm}) \cdot d \cdot [\text{Myosin}]}
 \end{aligned}$$

ΔA : Absorptionsdifferenz, ϵ : Extinktionskoeffizient, d : Schichtdicke, c : Konzentration.

ATPase-Puffer:

25mM HEPES pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT (frisch hinzugefügt).

2.6.2 Transienten-Kinetik

Während die *steady-state*-Kinetik die Gesamtheit des ATPase-Zyklus beschreibt, lassen sich mithilfe von transientenkinetischen Messungen Aussagen über einzelne Teilschritte des Zyklus machen. Viele dieser Einzelreaktionen sind so schnell, dass sie mit konventionellen Spektrometern nicht beobachtet werden können. Um dennoch eine kinetische Charakterisierung dieser Reaktionen zu ermöglichen, wurden besondere Methoden entwickelt. Es lassen sich zwei grundsätzliche Techniken unterscheiden:

1. schnelle Mischmethoden (*continuous-flow*-, *stopped-flow*-, *quench-flow*-Methode)
2. Relaxationsmethoden (Konzentrationsprung (*flash photolysis*)-, Temperatursprung-, Drucksprung- und elektrische Sprungverfahren sowie kernmagnetische Resonanzverfahren)

In dieser Arbeit wurden die oben genannten *stopped-flow*- und *flash photolysis*-Methoden angewandt. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

2.6.2.1 Stopped-flow-Technik

Die *stopped-flow* Technik zur Messung hoher Reaktionsgeschwindigkeiten (CHANCE et al., 1964) nutzt Druck, um die Reaktanden schnell homogen zu durchmischen. Die dadurch initiierte Reaktion kann direkt beobachtet werden, wenn einer der Reaktionsteilnehmer seine spektroskopischen Eigenschaften dabei verändert.

Das sogenannte *stopped-flow*-Spektrophotometer setzt sich aus zwei Einheiten zusammen: dem Spektrophotometer und der Mischapparatur. Die Mischapparatur wird über zwei Spritzen mit den Reaktanden befüllt (s. Abb. 13). Die Lösungen werden synchron mit hohem Druck (3 bar) über zwei getrennte Schläuche in die Mischkammer und weiter in eine Küvette mit wahlweise 2 oder 10 mm Schichtdicke geleitet. Der Fluss der Reaktionslösung wird in der Stoppspritze abgestoppt. Dabei stößt der Stempel der Spritze auf einen Mikroschalter (Trigger) und löst die Messung aus. Die Detektion der spektroskopischen Änderungen in der Küvette erfolgt mithilfe eines Photomultipliers. Ein angeschlossenes temperierbares Wasserbad gewährleistet eine konstante Temperatur der gesamten Mischeinheit. Die Totzeit, die Zeit zwischen dem Auslösen des Mischvorgangs und dem Beginn der Messung, begrenzt die obere zeitliche Auflösung der *stopped-flow*-Apparatur. Sie liegt bei den in dieser Arbeit verwendeten Geräten bei ~ 1 ms. Das angeschlossene Spektrophotometer ermöglicht Messungen sowohl von Absorptions- als auch Fluoreszenzänderungen. Das von einer 75 W Hg/Xe-Lampe ausgestrahlte Licht wird über Spiegel durch einen Monochromator und weiter über einen Quarzlichtleiter zur Küvette geleitet.

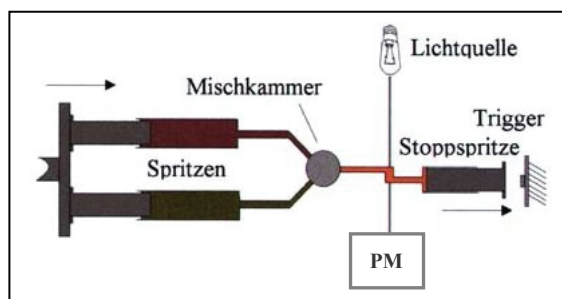


Abb. 13: Schematischer Aufbau eines *stopped-flow*-Spektrophotometers. PM: Photomultiplier (verändert nach KOSCHNER et al., 1997)

Die transientenkinetische Charakterisierung der Interaktion von Myosin mit Nukleotid und Aktin wird durch Änderungen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins sowie der extrinsischen Fluoreszenz industriell synthetisierter Nukleotidderivate (mant- (s. Abb. 14), Coumarinderivate) und Pyren-markiertem F-Aktin ermöglicht.

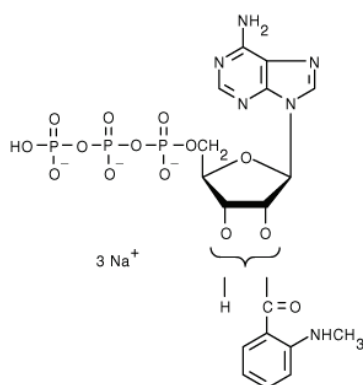


Abb. 14: Molekulare Struktur von mant-ATP

Eine Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz von Myosin geschieht bei 296 nm, das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt durch einen 320 nm *cut-off*-Filter zum Photomultiplier. Dieser Filter löscht Licht mit Wellenlängen unter 320 nm. Dadurch wird gewährleistet, dass nur das bei 348 nm emittierte Fluoreszenzlicht vom Photomultiplier detektiert und die Messung nicht durch das Anregungslicht gestört wird. Pyren bzw. die in dieser Arbeit verwendeten mant-Nukleotide werden bei 365 nm angeregt und das emittierte Licht durch einen 389 nm-*cut-off*-Filter von der Anregungsstrahlung getrennt. Das Ausgangssignal des Photomultipliers wird schließlich elektronisch gefiltert und von einem PC aufgezeichnet. Jede beobachtete Reaktion wird mehrmals gemessen und die aufgezeichneten Verläufe gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Eine einzelne Messung erfordert 35-50 µl jeder Reaktandenlösung. Dies übersteigt deutlich das Küvettenvolumen, so wird jedoch eine komplette Durchmischung und damit die Minimierung von Mischartefakten erreicht. Als Puffer wird *MOPS-Experimentalpuffer* verwendet. Die Reaktionsverläufe werden durch Anpassung von Exponentialfunktionen an den Signalverlauf mit der Software des jeweiligen *stopped-flow*-Spektrophotometers (KinetAsyst 2.0 bzw. π^* -ProData fitting tool) bzw. mit dem Programm Origin 7.0 ausgewertet.

MOPS-Experimentalpuffer:

20 mM MOPS pH 7.0, 100 mM KCl, 0 - 20 mM MgCl₂.

2.6.2.2 Flash-photolysis-Technik

Neben der *stopped-flow*-Technik wird in dieser Arbeit auch die zu den Relaxationsmethoden zählende *flash-photolysis*-Methode angewandt (WEISS et al., 2000). Sie dient der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes (K_1k_{-2}). Abbildung 15 (A) zeigt den schematischen Aufbau der *flash-photolysis*-Apparatur. Zum Einsatz kommt dabei die ATP-Käfigverbindung *caged*-ATP, bei der es sich um ein inertes ATP-Derivat handelt. Dieses kann durch einen Laserpuls mit einer Wellenlänge von 347 nm in ATP und Nitroacetophenon photolytisch gespalten werden (s. Abb. 15 (B)). Die freigesetzte ATP-Menge korreliert mit der Energie des Laserimpulses. Sie wird über die Messung der exponentiellen Abnahme der Absorption des *aci-nitro*-Zwischenzustands der *caged*-ATP-Umsetzung bei 405 nm durch Photomultiplier 1 ermittelt. Die Amplitude des Absorptionssignals ist proportional zu der freigesetzten Konzentration an ATP ($1 \text{ OD}_{405} = 1400 \mu\text{M ATP}$).

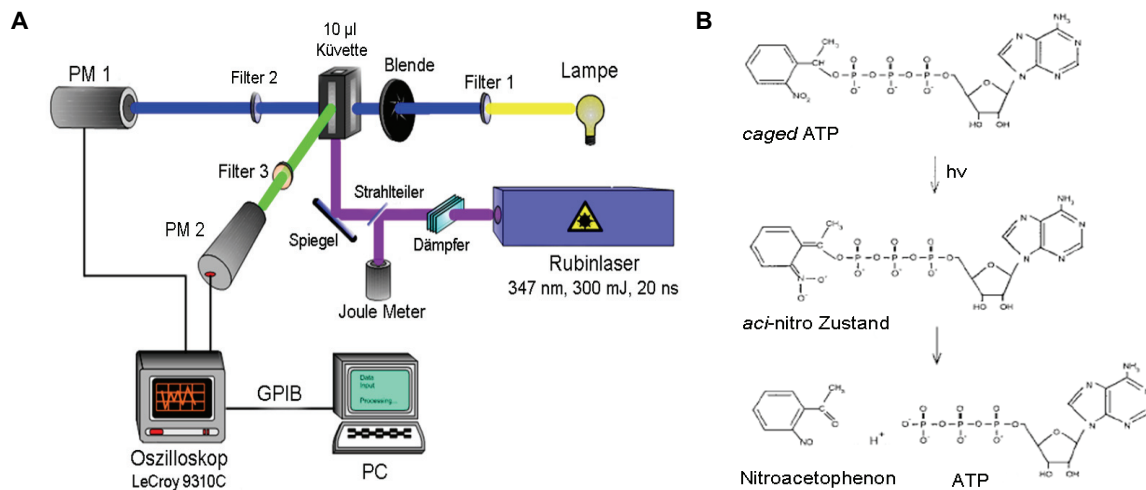


Abb. 15: (A) Schematischer Aufbau der *flash-photolysis*-Apparatur (verändert nach WEISS et al., 2000). (B) Photolyse von *caged*-ATP (verändert nach WEISS et al., 2000). Durch einen Laserpuls mit einer Wellenlänge von 347 nm wandelt sich *caged*-ATP in einen instabilen *aci-nitro* Zustand um, der eine erhöhte Absorption bei 405 nm aufweist. Dieser zerfällt schließlich zu Nitroacetophenon und ATP.

Für die Messung wird die folgende Reaktionslösung hergestellt:

- 50 mM KP_i -Puffer pH 7.4
- 25 mM KCl
- 5 mM $MgCl_2$
- 10 mM DTT
- 0.35 μM Myosin
- 1 μM F-Aktin
- 10 mM *caged*-ATP.

Die Lösung wird in eine 10 µl-Quarzküvette gefüllt und mit einem Laserpuls (Rubinlaser, 347 nm, 6mm Strahldurchmesser, < 300 mJ Pulsenergie, 20 ns Pulsdauer) bestrahlt. Das aus *caged*-ATP photolytisch freigesetzte ATP induziert die Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes. Damit geht ein exponentielles Absinken des Streulichtsignals einher, das durch Photomultiplier 2 im rechten Winkel

zum eingestrahlenen Laserlicht detektiert wird. Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Exponentialkurven weisen eine lineare Abhängigkeit von der freigesetzten ATP-Konzentration auf. Die Steigung einer an die Daten angepassten Gerade entspricht der Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}) der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes.

2.6.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation dient zur kontinuierlichen Beobachtung des Verhaltens massebehafteter Teilchen in einem starken Schwerfeld. Durch radiale und zeitabhängige Messung der Absorption während des Laufs wird die Konzentration der Teilchen in der Ultrazentrifugationszelle bestimmt. Prinzipiell können bei der analytischen Ultrazentrifugation zwei Arten von Experimenten unterschieden werden, die im Folgenden vorgestellt werden.

2.6.3.1 Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation

Die Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation erlaubt die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten s einer Spezies. Dabei werden die Teilchen einem starken Schwerfeld (bis zu 200 000 x g) ausgesetzt und ihre Sedimentationsgeschwindigkeit beobachtet. In diesen Experimenten werden Doppelsektor-Zellen verwendet, die die gleichzeitige Messung der Probe und einer Pufferreferenz ermöglichen. Die Sektorform dient dazu, die Sedimentation der Teilchen nicht durch Stöße mit der Wand zu beeinflussen. Die Geschwindigkeit (v) der Sedimentation ergibt sich aus der Svedberg-Gleichung:

$$v = \frac{m - \bar{v}\rho}{f} \cdot \omega^2 \cdot r = s \cdot \omega^2 \cdot r$$

v : Geschwindigkeit; m : Teilchenmasse; \bar{v} = partielles spezifisches Volumen; ρ = Dichte; f = Reibungskoeffizient; ω = Winkelgeschwindigkeit; r = Radius; s = Sedimentationskoeffizient.

Aus der Wanderung der Teilchengrenzschicht kann schließlich der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden. Dieser ist für Makromoleküle abhängig von der Dichte und Viskosität der umgebenden Lösung. Der ermittelte s -Wert $s_{T,Puffer}$ wird daher auf Standardbedingungen (20 °C, Wasser) zu $s_{20,w}$ umgerechnet. Eine Übersicht der Umrechnungen geben z. B. LEBOWITZ und Schuck (2002).

Die Sedimentationszentrifugation bietet weiterhin die Möglichkeit, die Homogenität einer Probe zu bestimmen. Enthält diese mehr als eine Spezies, stellt die gemessene Grenzschicht eine Summe der Grenzschichten der verschiedenen Spezies dar. Die Konzentration einer Spezies kann als Funktion $c(x,t)$ mit der Entfernung x zum Rotormittelpunkt zu einem Zeitpunkt t des Laufs beschrieben werden. Mittels Parametrisierung kann $c(x,t)$ nach Korrektur um die radiale Verdünnung in der sektorförmigen Zelle in eine Sedimentationskoeffizienten-Verteilung $c(s)$ umgewandelt werden:

$$c(s) = c \left\{ \frac{\ln\left(\frac{x}{x_m}\right)}{\int_0^r \omega^2 dt'} \right\} \cdot \left(\frac{x}{x_m}\right)^2$$

c : Konzentration; s : Sedimentationskoeffizient; x : Teilchenentfernung zum Rotormittelpunkt; x_m : Entfernung des Meniskus zum Rotormittelpunkt; r : Radius; ω : Winkelgeschwindigkeit.

Zur übersichtlichen Darstellung der s -Wert-Verteilung wird $dc(s)/ds$ gegen den $s_{20,w}$ -Wert aufgetragen.

Ultrazentrifugationspuffer:

50 mM Tris pH 8.0, 300 mM KCl, 88 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1mM DTT.

2.6.3.2 Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation

Mithilfe der Sedimentation-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation kann das Molekulargewicht einer Proteinspezies ermittelt werden. Es werden geringere Drehzahlen als bei der Sedimentationszentrifugation angewandt, um ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion der Spezies zu erreichen. Das Einstellen des Gleichgewichts wird durch stündliche Absorptionsmessung der Probe beobachtet. Der Gleichgewichtszustand gilt als erreicht, wenn sich die gemessenen Gradienten für mehrere Stunden nicht mehr verändern. Schließlich werden die Makromoleküle bei höheren Drehzahlen sedimentiert, um die Pufferabsorption als Korrekturwert zu erhalten. Die Molmasse kann schließlich durch Anpassung einer Exponentialfunktion an die Speziesverteilung in der Zelle nach Einstellen des Gleichgewichts mithilfe der Gleichung

$$A^{280\text{ nm}}(x) = A_0 + A^{280\text{ nm}}(x_0) \cdot e^{\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{2RT}\omega^2(x^2-x_0^2)}$$

$A^{280\text{ nm}}$: Proteinabsorption bei 280 nm; A_0 : Grundabsorption (Bestimmung erfolgt nach Sedimentation aller Proteine bei 44000 rpm nach Ende des Laufs); x_0 : Referenzposition; M: Molmasse; \bar{v} : partielles spezifisches Volumen; ρ : Dichte der Lösung; R: allgemeine Gaskonstante; T: Temperatur; ω : Winkelgeschwindigkeit; x: Entfernung zu Rotormittelpunkt

bestimmt werden.

KAPITEL III

ERGEBNISSE

3.1 Der molekulare Mechanismus der Schalter-2 vermittelten Regulation von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen durch freie Mg^{2+} -Ionen

Niedrige Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen führen zu einer beschleunigten Mg^{2+} -ADP-Freisetzung verschiedener Klasse-1 und Klasse-5 Myosine. Dies resultiert in einer geringeren Stabilität des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes und folglich in einer Abnahme des zeitlichen Anteils des ATPase-Zyklus (*duty ratio*), den die Myosine im stark Aktin-gebundenen Zustand verbringen (FUJITA-BECKER et al., 2005; HANNEMANN et al., 2005; DÜRRWANG et al., 2006; TAFT et al., 2008). Um die molekulare Grundlage dieses Regulationsmechanismus aufzuklären, wurden die Aminosäuresequenzen der hochkonservierten Schalter-2 Region von Myosinen unterschiedlicher Klassen und Organismen verglichen. Diese Region bildet mit der P-Schleife und Schalter-1 die Nukleotidbindungstasche und ist an der Koordination von Nukleotid und Mg^{2+} beteiligt (RAYMENT et al., 1993). Auf der Basis von Mutationsstudien wird eine wesentliche Funktion von Schalter-2 bei der Produktdissoziation postuliert (SASAKI et al., 1998). Der angefertigte Sequenzvergleich zeigt, dass alle bislang bekannten Mg^{2+} -regulierten Myosine in der Schalter-2 Konsensussequenz (DIXGFE) ein Tyrosin aufweisen, während sich in Myosinen wie *DdMyosin-2* oder *DdMyosin-1B*, die nicht durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen reguliert werden (TSAVALIARIS et al., 2008), an dieser Stelle ein Phenylalanin, Serin oder Alanin befindet (s. Abb. 16). Es kann daher postuliert werden, dass Schalter-2 und insbesondere diese Aminosäure eine entscheidende Rolle im molekularen Mechanismus von Myosinen mit niedriger bzw. hoher *duty ratio* und ihrer Mg^{2+} -Sensitivität spielen.

<i>DdMyosin-1B</i>	381	I	G	I	L	D	I	F	G	F	E	I	F	E	K	N	G
* <i>DdMyosin-1D</i>	381	I	G	I	L	D	I	Y	G	F	E	I	F	E	K	N	G
* <i>DdMyosin-1E</i>	382	I	G	I	L	D	I	Y	G	F	E	V	F	O	N	N	S
<i>DdMyosin-2</i>	450	I	G	V	L	D	I	S	G	F	E	I	F	K	V	N	S
* <i>DdMyosin-5b</i>	481	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	S	F	E	V	N	G
<i>HsMyosin-5a</i>	433	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	I	N	S
<i>HsMyosin-5b</i>	434	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	V	N	S
<i>HsMyosin-5c</i>	431	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	D	V	N	S
* <i>GgMyosin-5a</i>	433	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	I	N	S
<i>DmMyosin-5</i>	443	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	V	N	S
<i>SsMyosin-6</i>	434	I	G	V	L	D	I	A	G	F	E	Y	F	E	H	N	S
<i>DmMyosin-7</i>	427	I	G	V	L	D	I	F	G	F	E	N	F	D	O	N	S
<i>HsMyosin-9b</i>	516	I	G	V	L	D	I	F	G	F	E	D	F	E	R	N	S
<i>NtMyosin-11</i>	429	I	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	S	F	K	T	N	S

Abb. 16: Sequenzvergleich der Schalter-2 Region (rot umrandet) von Myosinen aus unterschiedlichen Organismen und Klassen. Die nicht konservierte Aminosäure ist farblich gekennzeichnet. Der Stern markiert Myosine, die durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen reguliert werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit Konstrukte von vier Myosinen des Organismus *D. discoideum* aus drei verschiedenen Klassen mit einer Punktmutation in Schalter-2 angefertigt. *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b* werden durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert und weisen bei hohen Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen eine langsame geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziation und eine hohe *duty ratio* auf. Das Tyrosin in der Schalter-2 Region dieser Myosine wurde durch ein Phenylalanin ersetzt. Die beiden Myosine *DdMyosin-1B* und *DdMyosin-2* sind hingegen, unabhängig von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen, durch eine schnelle ADP-Dissoziation und eine niedrige *duty ratio* gekennzeichnet. In ihren Schalter-2 Regionen wurde das Phenylalanin bzw. Serin durch ein Tyrosin ausgetauscht. Die Auswirkungen der Punktmutation auf die Mg^{2+} -Sensitivität der Myosine wurde in einer umfangreichen Analyse der kinetischen Eigenschaften der Mutanten untersucht. Durch den Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden Daten der Wildtyp-Myosine sollten neue Erkenntnisse gewonnen werden, in welcher Weise Schalter-2 in verschiedenen Myosinklassen kinetische Parameter wie die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit und so den molekularen Mechanismus von Myosinen mit niedriger bzw. hoher *duty ratio* beeinflusst.

3.1.1 Kinetische Charakterisierung von *DdMyosin-1E-Y388F* und *DdMyosin-5b-Y487F*

Im Folgenden wird die kinetische Analyse der beiden Mutanten Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F beschrieben. Die Auswirkungen der Mutation auf den ATPase-Zyklus der Myosine wurden im Fließgleichgewicht sowie mit transientenkinetischen Methoden untersucht. Zur Verdeutlichung der aus der Mutation resultierenden Veränderungen werden die ermittelten kinetischen Parameter denen der Wildtyp-Myosine gegenübergestellt.

3.1.1.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F

Die ATPase-Aktivität der Mutanten Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F wurde in Abwesenheit von Aktin (k_{basal}) sowie in Anwesenheit von 5 - 80 μM F-Aktin untersucht. Durch Anpassung einer Hyperbel an die gemessenen ATP-Umsatzgeschwindigkeiten (k_{obs}) entsprechend den in Kapitel 2.6.1 vorgestellten Modellen wurden die apparente Gleichgewichtskonstante (K_{app}) und die maximale Aktin-aktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit (k_{cat}) für Myosin-1E-Y388F ermittelt (s. Abb. 17). Die ATPase-Aktivität von Myosin-5b-Y487F zeigt eine annähernd lineare Abhängigkeit von der Aktin-Konzentration, wodurch k_{cat} und K_{app} nur abgeschätzt werden können. Tabelle 5 fasst die ATPase-Parameter der Mutanten im Vergleich mit den Daten der Wildtyp-Myosine zusammen.

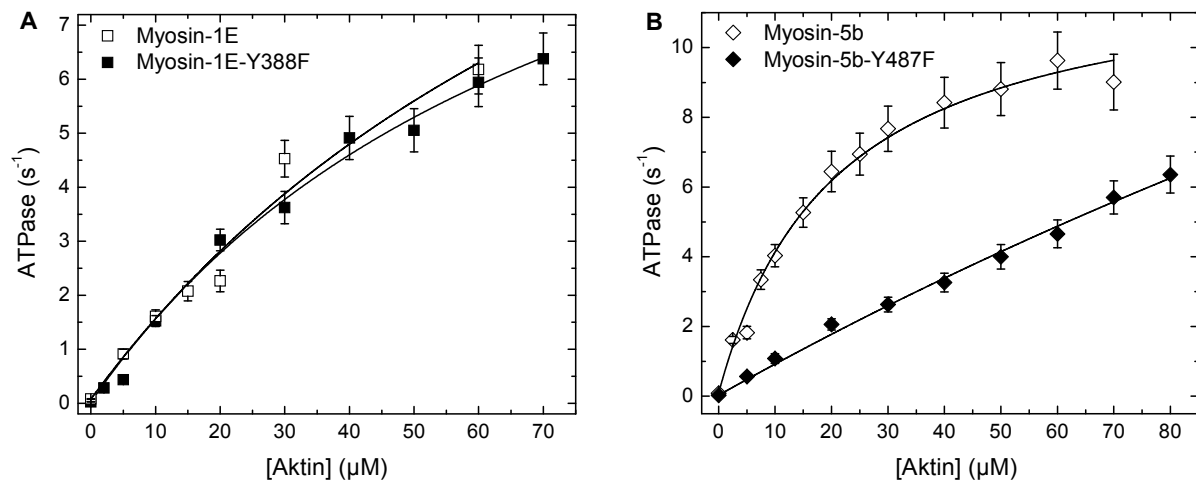


Abb. 17: Messung der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von Myosin-1E-Y388F (A) und Myosin-5b-Y487F (B). Zum Vergleich wurden die ATPase-Daten der Wildtyp-Myosine in die Abbildungen integriert (DÜRRWANG et al., 2006; TAFT et al., 2008).

Tab. 5: Parameter der ATPase-Aktivität von Myosin

Konstante	Myosin-1E		Myosin-5b	
	Wildtyp*	Y388F	Wildtyp [§]	Y487F
k_{basal} (s ⁻¹)	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.01
k_{cat} (s ⁻¹)	15.4 ± 3.0	13.4 ± 2.0	12.4 ± 0.5	> 6.1
K_{app} (μM)	91 ± 30	77 ± 17	21 ± 2	> 80
$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	0.17 ± 0.06	0.17 ± 0.05	0.59 ± 0.12	0.1 ± 0.03

*DÜRRWANG et al. (2006)

[§] TAFT et al. (2008)

Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F weisen eine 4- bzw. 2-fach kleinere basale ATPase-Aktivität auf. Die Parameter der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von Myosin-1E werden nur in geringem Maß durch die Mutation beeinflusst. Im Gegensatz dazu ist Myosin-5b-Y487F durch eine deutlich geringere Affinität zu Aktin in Anwesenheit von ATP gekennzeichnet, die apparente Gleichgewichtskonstante (K_{app}) steigt um einen Faktor größer 4 an. Dies spiegelt sich auch in der apparenten Aktin-Bindungskonstante ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) wieder, welche als Steigung einer, an die ATP-Umsatzgeschwindigkeiten bei geringen Aktinkonzentrationen angepassten, Gerade erhalten wurde. Im Vergleich zu Myosin-5b Wildtyp ist diese um den Faktor 6 kleiner.

3.1.1.2 Transientenkinetische Charakterisierung von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F

Die ATPase-Eigenschaften von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F zeigen, dass die Mutation in Schalter-2 den ATP-Umsatz der Myosine beeinflusst. Um diese Veränderungen auf einzelne Reaktionsschritte des ATPase-Zyklus zurückführen zu können, wurde eine transientenkinetische Analyse der Motoren zur Ermittlung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten, die ihre Interaktion mit Nukleotiden und Aktin beschreiben, durchgeführt. Die Bestimmung der transientenkinetischen Daten erfolgte entsprechend den in Kapitel 1.5.2 dargestellten kinetischen Modellen (MALNASI-CSIMADIA et al. (2001) und ZENG et al (2004) entsprechend BAGSHAW und Trentham (1974), MILLAR und Geeves, 1983; SIEMANKOWSKI und White, 1984).

3.1.1.2.1 Interaktion von Myosin und Akto-Myosin mit ATP

Die Bindung und Hydrolyse von ATP durch Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F resultiert in einem Anstieg der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz, der durch eine Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben werden kann. Im Bereich von 2.5 - 25 μM weisen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) eine lineare Abhängigkeit von der ATP-Konzentration auf (s. Abb. 18 (A)). Die Steigung der Gerade definiert die apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung ($K_1 k_{+2}$) der Bindung von ATP an Myosin zu $K_1 k_{+2} = 1.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Myosin-1E-Y388F bzw. $K_1 k_{+2} = 0.47 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Myosin-5b-Y487F. Bei ATP-Konzentrationen größer 25 μM weichen die Geschwindigkeitskonstanten von der Linearität ab und nähern sich einem Sättigungswert an (s. Abb. 18 (B)). Durch Anpassung einer Hyperbel an die k_{obs} -Werte wurden die Dissoziationsgleichgewichtskonstante ($1/K_1$) des Myosin-ATP-Kollisionskomplexes sowie der Maximalwert (k_{max}) zu $1/K_1 > 800 \mu\text{M}$ und $k_{\text{max}} \sim 600 \text{s}^{-1}$ im Fall von Myosin-1E-Y388F bzw. $1/K_1 > 2300 \mu\text{M}$ und $k_{\text{max}} \sim 1000 \text{s}^{-1}$ für Myosin-5b-Y487F bestimmt. k_{max} entspricht für beide Mutanten gemäß RITCHIE et al. (1993) der Geschwindigkeit des Hydrolyseschritts ($k_{+3} + k_{-3}$).

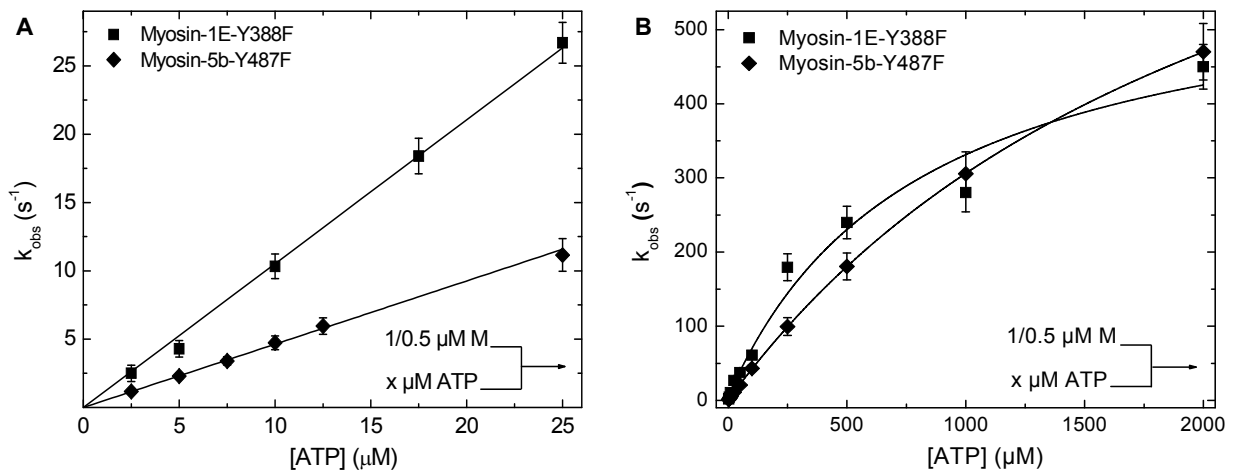


Abb. 18: ATP-Bindung an Myosin. (A) Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) folgen im Bereich von 2.5 - 25 μM ATP einem linearen Anstieg mit der Steigung $K_1 k_{+2}$. (B) Bei ATP-Konzentrationen $> 25 \mu\text{M}$ weisen die Geschwindigkeitskonstanten einen hyperbolischen Verlauf auf, der durch die Parameter ($k_{+3} + k_{-3}$) und $1/K_1$ bestimmt wird.

Die Ermittlung der ATP-Bindungseigenschaften der Akto-Myosin-Komplexe erfolgte durch Beobachtung des exponentiellen Fluoreszenzanstiegs, der bei der ATP-induzierten Dissoziation von Pyren-Akto-Myosin auftritt. Wie in Abb. 19 (A) dargestellt, steigen die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten bei ATP-Konzentrationen zwischen 2.5 und 25 μM linear an. Die apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung ($K_1 k_{+2}$) wird durch die Steigung der angepassten Gerade zu $0.41 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Myosin-1E-Y388F) bzw. $0.09 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Myosin-5b-Y487F) bestimmt. Bei höheren ATP-Konzentrationen folgen die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten einer Hyperbel (s. Abb. 19 (B)), die die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes vom stark in den schwach Aktin-gebundenen Zustand (k_{+2}) und die Gleichgewichtskonstante der ATP-Dissoziation von Akto-Myosin-ATP ($1/K_1$) definiert. Es wurden Werte von $k_{+2} = 400 \text{s}^{-1}$ und $1/K_1 = 3000 \mu\text{M}$ (Myosin-1E-Y388F) bzw. $k_{+2} = 200 \text{s}^{-1}$ und $1/K_1 = 2000 \mu\text{M}$ (Myosin-5b-Y487F) erhalten.

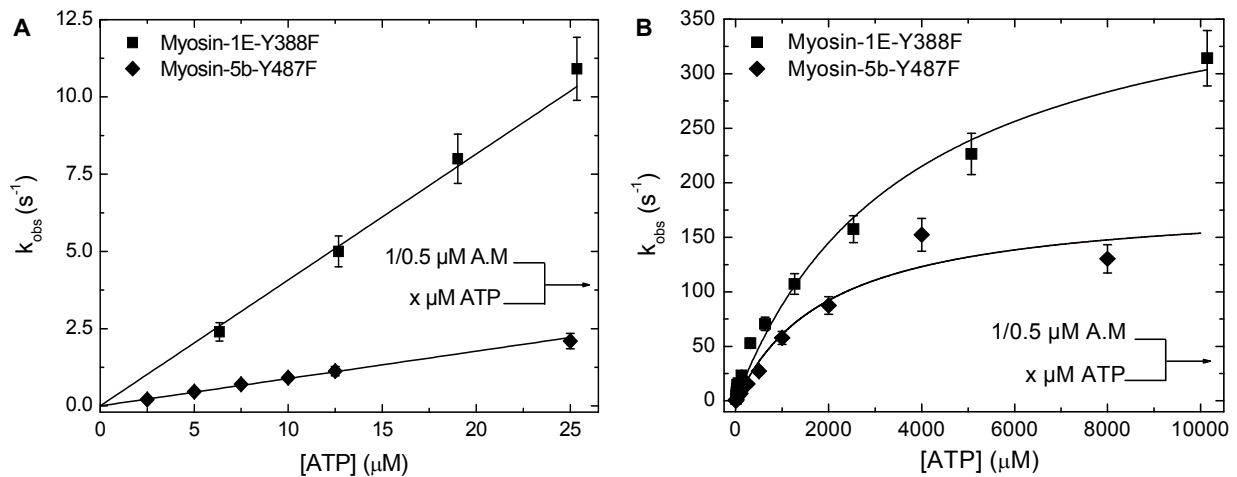


Abb. 19: ATP-induzierte Dissoziation von Pyren-Akto-Myosin. **(A)** An die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von 2.5 - 25 μM ATP wurde eine Gerade mit der Steigung K_1k_{+2} angepasst. **(B)** Beim Mischen des Pyren-Akto-Myosin-Komplexes mit ATP-Konzentrationen $> 25 \mu\text{M}$ folgen die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten einer Hyperbel mit den Parametern k_{+2} und $1/K_1$.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Interaktion von ATP mit Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F im Aktin-freien Zustand sowie im Komplex mit Aktin sind in Tab. 6 zusammengefasst und den Daten der Wildtyp-Myosine gegenübergestellt.

Tab. 6: Transientenkinetische Parameter der Wechselwirkung von Myosin und Akto-Myosin mit ATP

Konstante	Myosin-1E		Myosin-5b	
	Wildtyp*	Y388F	Wildtyp§	Y487F
$K_1k_{+2} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	0.96 ± 0.03	1.1 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.02
$k_{+3} + k_{-3} (\text{s}^{-1})$	~ 900	~ 600	~ 300	~ 1000
$1/K_1 (\mu\text{M})$	> 950	> 800	> 640	> 2300
$K_1k_{+2} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	0.40 ± 0.002	0.41 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.09 ± 0.01
$k_{+2} (\text{s}^{-1})$	~ 750	~ 400	~ 75	~ 200
$1/K_1 (\mu\text{M})$	~ 1900	~ 3000	~ 400	~ 2000

*DÜRRWANG et al. (2006)

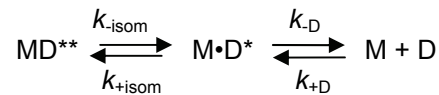
§ TAFT et al. (2008)

Die ATP-Bindungseigenschaften von Myosin-1E-Y388F und Akto-Myosin-1E-Y388F werden nur geringfügig durch die Mutation beeinflusst. Die kinetischen Parameter stimmen innerhalb eines Faktors von 2 überein. Im Gegensatz dazu führt die Mutation in Myosin-5b-Y487F zu Störungen der Interaktion des Myosins und des Akto-Myosin-Komplexes mit ATP. Neben einer 3-fach höheren Hydrolysegeschwindigkeit in Abwesenheit von Aktin weisen Myosin-5b-Y487F und Akto-Myosin-5b-Y487F mit $(1/K_1) > 2300 \mu\text{M}$ und $(1/K_1) \sim 2000 \mu\text{M}$ eine 3.5-fach bzw. 5-fach höhere Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Kollisionskomplexes mit ATP auf. Die Isomerisierung des Akto-Myosin-5b-Y487F-ATP-Komplexes ist um den Faktor 2.5 beschleunigt ($k_{+2} = 200 \text{ s}^{-1}$).

3.1.1.2.2 Interaktion von Myosin mit ADP

3.1.1.2.2.1 Auflösung von zwei Myosin-ADP-Zuständen

Für verschiedene Klasse-1 und Klasse-5 Myosine mit hoher Affinität zu ADP in Ab- und Anwesenheit von Aktin wurde die Existenz zweier Myosin-ADP-Zustände entsprechend dem folgenden Schema der Interaktion von Myosin mit ADP beschrieben (JONTES et al., 1997; GEEVES et al., 2000; ROSENFELD und Sweeney, 2004).



Diese wurden als Anpassung an den spannungssensitiven Mechanismus interpretiert, der die ADP-Dissoziation von Klasse-1 Myosinen, die als Spannungssensoren fungieren, sowie von prozessiven Myosinen der Klasse-5, reguliert (NYITRAI und Geeves, 2004). Auch Myosin-1E und Myosin-5b weisen eine hohe Affinität zu ADP in Ab- und Anwesenheit von Aktin auf. Um zu untersuchen, ob diese Motoren durch zwei ADP-Zustände gekennzeichnet sind, wurde die ADP-Dissoziation von Myosin analysiert. Dazu wurde ADP aus dem Komplex mit Myosin durch einen Überschuss an ATP verdrängt. Die Geschwindigkeit des intrinsischen Fluoreszenzanstiegs der Bindung von ATP wird durch die langsamere ADP-Abgabe determiniert. Sowohl Myosin-1E als auch Myosin-5b zeigen eine biphasische Fluoreszenzänderung der ADP-Dissoziation, die sich durch die Summe zweier Exponentialfunktionen beschreiben lässt (s. Abb. 20). Die beiden Phasen weisen im Fall von Myosin-1E annähernd identische Amplituden von 2.8 und 3.0 % mit Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{obs}} = 6.39 \text{ s}^{-1}$ bzw. 1.77 s^{-1} auf. Für Myosin-5b sind sie durch Amplituden von 16.0 und 1.8 % und Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{obs}} = 65.4 \text{ s}^{-1}$ bzw. 7.48 s^{-1} gekennzeichnet.

Die Messung wurde auch mit den Mutanten der beiden Myosine durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Mutation in Schalter-2 Auswirkung auf die ADP-Dissoziation hat. Wie die Wildtyp-Myosine zeigt Myosin-1E-Y388F eine biphasische Fluoreszenzänderung (s. Abb. 20 (A)). Die Amplituden der beiden Phasen bleiben für Myosin-1E unverändert, die Geschwindigkeitskonstanten steigen jedoch durch die Mutation (Y388F) um den Faktor 4 auf $k_{\text{obs}} = 26.4 \text{ s}^{-1}$ bzw. 5.17 s^{-1} . Im Fall von Myosin-5b-Y487F sinkt die Gesamtamplitude auf 1.8 %. Der Verlauf des Signals kann durch eine Exponentialfunktion 1. Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 24.1 \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden (s. Abb. 20 (B)).

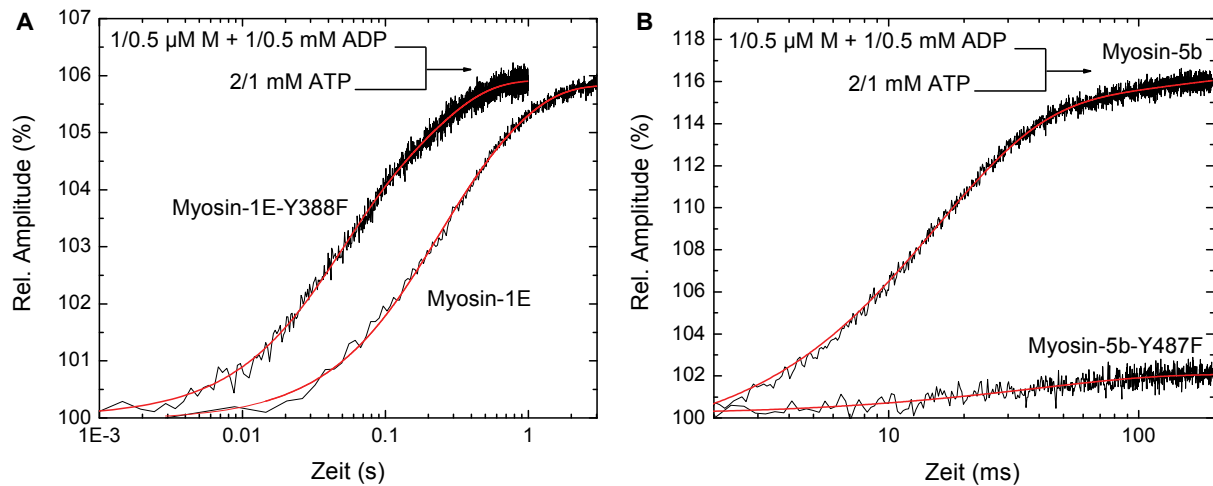


Abb. 20: Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Myosin-1E-388F (A) und Myosin-5b-Y487F (B) im Vergleich mit den Wildtyp-Myosinen. Die Fluoreszenzänderungen von Myosin-1E, Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b zeigen einen biphasischen Verlauf. Die ADP-Dissoziation von Myosin-5b-Y487F resultiert hingegen in einer monophasischen Signaländerung.

3.1.1.2.2.2 Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Myosin-ADP

Um zu analysieren, wie sich die veränderten ADP-Dissoziationsgeschwindigkeiten auf die Affinität der Motoren zu ADP auswirkt, wurde Myosin mit steigenden Konzentrationen an ADP inkubiert und mit einem hohen Überschuss an ATP gemischt. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen weisen für beide Myosine einen biphasischen Verlauf auf. Mit steigenden ADP-Konzentrationen nimmt die Amplitude der schnellen Phase ab, während die Amplitude der langsamen Phase zunimmt. (s. Abb. 21 (A), (C)). Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit einem Modell, in dem die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Phase durch die Bindung von ATP an Myosin bestimmt wird und der langsame Prozess die oben dargestellte ATP-Bindung nach Verdrängung von ADP aus dem Myosin-ADP-Komplex darstellt. Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Phasen sind daher unabhängig von der eingesetzten ADP-Konzentration. Abbildung 21 (B) und (D) zeigt die Auftragung der relativen Amplituden gegen die ADP-Konzentration. Die an den Verlauf angepassten Hyperbeln definieren die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von Myosin-ADP zu $K_D = 25.8 \mu\text{M}$ für Myosin-1E-Y388F sowie $K_D = 109 \mu\text{M}$ für Myosin-5b-Y487F.

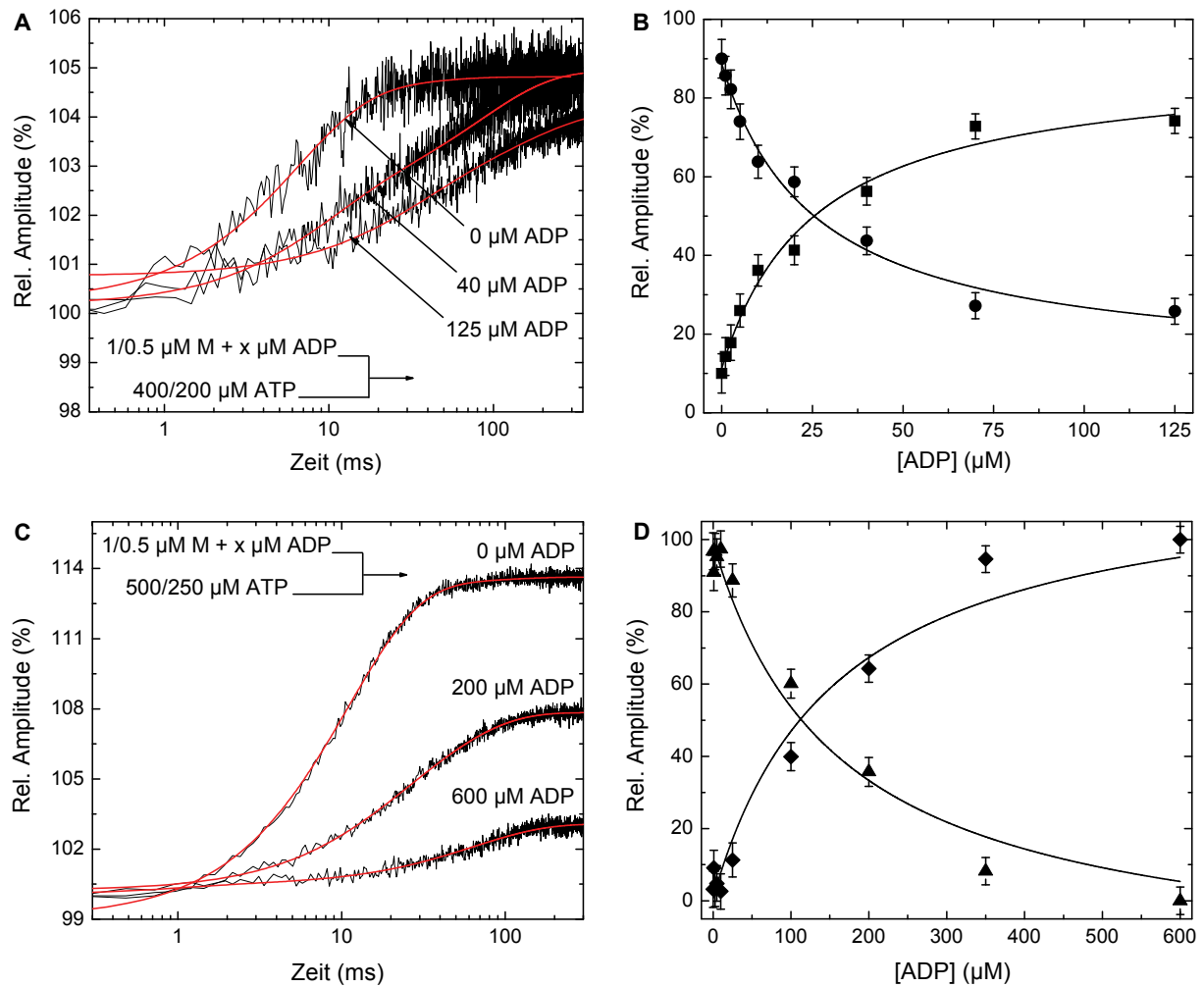


Abb. 21: Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) von Myosin-1E-Y388F-ADP (A, B) und Myosin-5b-Y487F-ADP (C, D). (A,C) Die gemessenen Fluoreszenzänderungen zeigen einen biphasischen Verlauf, der mit der Summe zweier Exponentialfunktionen beschrieben werden kann. (B, D) Durch Anpassen einer Hyperbel an die Auftragung der relativen Amplituden der beiden Phasen gegen die ADP-Konzentration wurde K_D ermittelt.

Tabelle 7 fasst die Daten der Interaktion von ADP mit Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F im Vergleich mit den Wildtyp-Myosinen zusammen.

Tab. 7: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Myosin mit ADP

Konstante	Myosin-1E		Myosin-5b	
	Wildtyp	Y388F	Wildtyp	Y487F
k_{D1} (s^{-1})	6.39 ± 0.51	26.4 ± 1.9	65.4 ± 3.9	24.1 ± 1.2
k_{D2} (s^{-1})	1.77 ± 0.24	5.17 ± 0.52	7.48 ± 0.78	-
Rel. Amplitude 1 (%)	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.2	16.0 ± 1.5	1.8 ± 0.2
Rel. Amplitude 2 (%)	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	1.8 ± 0.2	-
K_D (μ M)	7.0 ± 0.4	25.8 ± 2.1	$5.5 \pm 0.90^*$	109 ± 11

*TAFT et al. (2008)

Beide Mutanten sind durch gestörte ADP-Bindungseigenschaften gekennzeichnet. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Myosin-ADP-Komplexes ist für Myosin-1E-Y388F um den Faktor 4 ($K_D = 25.8 \mu$ M) und für Myosin-5b-Y487F um den Faktor 20 ($K_D = 109 \mu$ M) erhöht. Die

Wildtyp-Myosine sind durch eine biphasische Fluoreszenzänderung der ADP-Dissoziation gekennzeichnet. Dies lässt auf eine der ADP-Abgabe vorausgehende Isomerisierung des Myosin-ADP-Komplexes schließen. Durch die Mutation Y388F in Myosin-1E sind beide Prozesse um den Faktor 4 beschleunigt, die beiden Phasen können daher nicht den Prozessen zugeordnet werden. Im Fall von Myosin-5b Wildtyp lässt sich vermuten, dass die schnelle Phase der Fluoreszenzänderung ($k_{D1} = 65.4 \text{ s}^{-1}$) die Isomerisierung des Myosin-ADP-Komplexes und die langsame Phase ($k_D = 7.48 \text{ s}^{-1}$) die ADP-Dissoziation beschreibt. Diese wird durch die Mutation (Y487F) um den Faktor 3 zu $k_D = 24.1 \text{ s}^{-1}$ beschleunigt und trägt so zu der 20mal niedrigeren Affinität von Myosin-5b-Y487F zu ADP bei.

3.1.1.2.3 Interaktion von Akto-Myosin mit ADP

Die Beeinträchtigung der Interaktion von Myosin-1E und Myosin-5b mit ADP durch den Austausch des Tyrosins zu Phenylalanin in Schalter-2 lässt vermuten, dass diese Aminosäure entsprechend der Hypothese, die der Arbeit zugrunde liegt, auch die Wechselwirkung der Akto-Myosin-Komplexe mit ADP beeinflusst. Im Folgenden werden die Auswirkungen der Mutation auf die ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP, ihre Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen sowie auf die Affinität der Akto-Myosin-Komplexe zu ADP näher untersucht.

3.1.1.2.3.1 Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP und ihre Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen

Die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation wurde durch Verdrängung von mADP aus dem Akto-Myosin-mADP-Komplex durch einen Überschuss an ADP bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen bestimmt. Die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ($[\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$) in der Reaktionslösung wurde mit Hilfe des Programms „MaxChelator 2004“ unter Angabe der Ausgangskonzentrationen an ADP und Mg^{2+} sowie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur berechnet (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>; PATTON et al., 2004). Die beobachteten Fluoreszenzänderungen können durch Exponentialfunktionen 1. Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_{AD} beschrieben werden. Es wurden Werte von $k_{AD} = 180 \text{ s}^{-1}$ für Myosin-1E-Y388F und $k_{AD} = 233 \text{ s}^{-1}$ für Myosin-5b-Y487F in einem Konzentrationsbereich von 0.04 bis 10 mM $[\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$ erhalten. Abbildung 22 zeigt eine Auftragung der beobachteten ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten gegen die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen im Vergleich mit den Wildtyp-Myosinen.

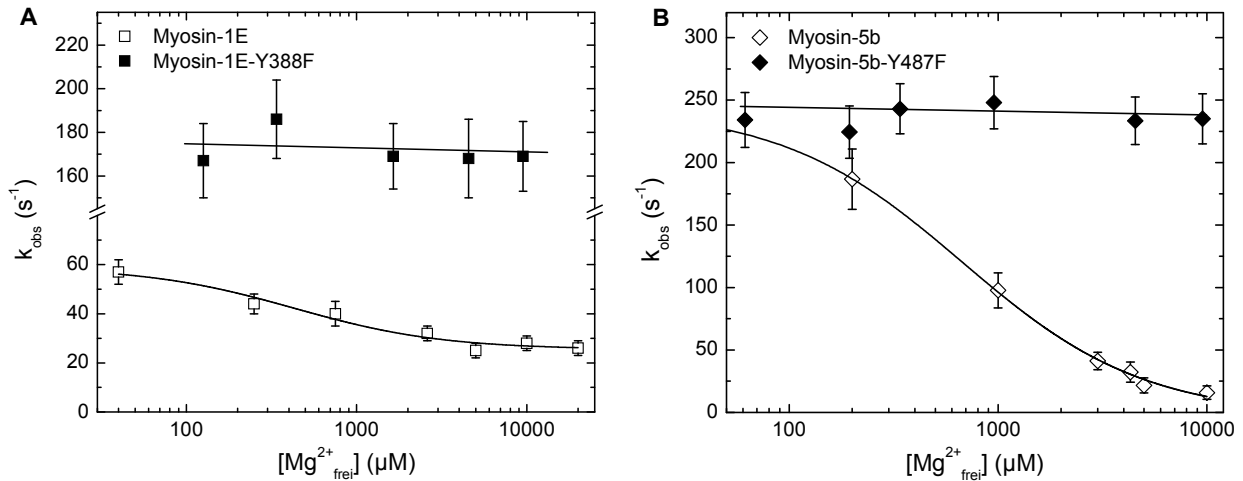


Abb. 22: Ermittlung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{AD}) von Akto-Myosin-1E-Y388F-ADP (**A**) und Akto-Myosin-5b-Y487F-ADP (**B**) in Abhängigkeit von $[\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$. 1 μM Akto-Myosin wurde mit 80 μM mADP inkubiert bei verschiedenen Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen mit 1 mM ADP gemischt. Als Vergleich wurden die entsprechenden Daten der Wildtyp-Myosine abgebildet (DÜRRWANG et al., 2006; TAFT et al., 2008).

3.1.1.2.3.2 Einfluss von ADP auf die ATP-induzierte Dissoziation von Akto-Myosin

Die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP (K_{AD}) wurde durch Messung der ADP-Inhibition der ATP-induzierten Dissoziation von Pyren-Akto-Myosin ermittelt. Die erhaltenen Fluoreszenzänderungen folgen Exponentialfunktionen 1. Ordnung (s. Abb. 23, eingefügte Graphen), deren Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) mit steigenden ADP-Konzentrationen sinken. Abbildung 23 zeigt die Auftragung von k_{obs} gegen die ADP-Konzentration. Die Anpassung einer Hyperbel an die Daten ergibt einen Wert von $K_{\text{AD}} = 81 \mu\text{M}$ für Akto-Myosin-1E-Y388F bzw. $K_{\text{AD}} = 96 \mu\text{M}$ im Fall von Myosin-5b-Y487F.

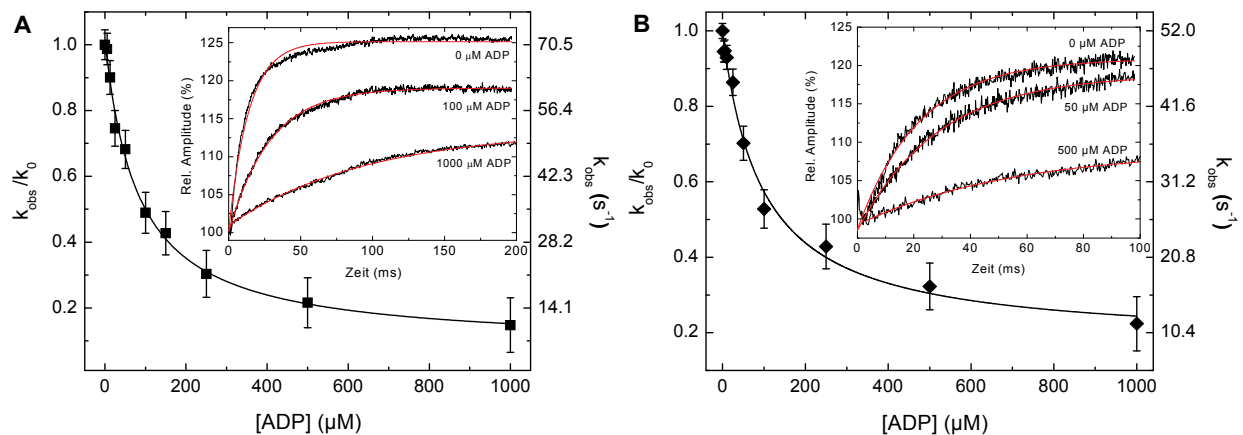


Abb. 23: Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K_{AD} der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-1E-Y388F-ADP (**A**) und Akto-Myosin-5b-Y487F-ADP (**B**). Es wurde 1 μM Pyren-Akto-Myosin mit steigenden Konzentrationen an ADP inkubiert und mit 1 mM ATP gemischt. Die erhaltenen Transienten (eingefügte Graphen) zeigen einen monophasischen Verlauf. Mit steigender ADP-Konzentration nimmt die Geschwindigkeit der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes ab. Aus der Auftragung der gemessenen bzw. normalisierten Geschwindigkeitskonstanten der Exponentialfunktionen wurde durch Anpassung einer Hyperbel K_{AD} ermittelt.

Unter Verwendung der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten (K_{AD}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{AD}) wurde die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung der Akto-Myosin-Komplexe (k_{+AD}) gemäß

$$K_{AD} = \frac{k_{-AD}}{k_{+AD}}$$

berechnet. Tabelle 8 listet die transientenkinetischen Parameter der Interaktion von Akto-Myosin mit ADP im Vergleich mit den Daten der Wildtyp-Myosine auf.

Tab. 8: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Akto-Myosin mit ADP

Konstante	Myosin-1E		Myosin-5b	
	Wildtyp*	Y388F	Wildtyp [§]	Y487F
k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.5 ± 0.5	2.2 ± 0.3	4.0 ± 0.7	2.4 ± 0.3
k_{AD} (s^{-1})	28 ± 4	180 ± 18	21.6 ± 6.0	233 ± 18
$K_i [\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$ (μM)	800 ± 145	-	440 ± 100	-
K_{AD} (μM)	12 ± 2	81 ± 9	5.4 ± 2.0	96 ± 15

* DÜRRWANG et al., 2006

§ TAFT et al., 2008

Die ermittelten kinetischen Parameter zeigen, dass die Interaktion der Myosine mit ADP in Anwesenheit von Aktin durch die Mutation beeinflusst wird. Aufgrund einer beschleunigten ADP-Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes ist die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Akto-Myosin-ADP-Komplexes (K_{AD}) für Myosin-1E-Y388F um den Faktor 7 ($K_{AD} = 81 \mu\text{M}$) und für Myosin-5b-Y487F um den Faktor 18 ($K_{AD} = 96 \mu\text{M}$) erhöht. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Myosinen ist die Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Akto-Myosin somit nicht geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus der Mutanten. Darüber hinaus hat die Mutation zur Folge, dass die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit der Akto-Myosin-ADP-Komplexe nicht mehr durch freie Mg^{2+} -Ionen beeinflusst wird.

3.1.1.2.4 Interaktion von Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin

Konformationsänderungen in der Nukleotidbindungstasche von Myosinen, die während der ATP-Umsetzung auftreten, sind mit strukturellen Änderungen im Bereich der Aktinbindungsspalte gekoppelt. Myosine mit hoher *duty ratio* sind in der Regel durch eine hohe Aktin-Affinität auch in Anwesenheit von ADP gekennzeichnet, um eine Dissoziation des Akto-Myosin-ADP-Komplexes zu verhindern und die Dauer des stark-Aktin-gebundenen Zustands zu verlängern. Die dargestellten Messungen zeigen, dass die Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin in Schalter-2 die ADP-Dissoziation der Akto-Myosin-ADP-Komplexe von Myosin-1E und Myosin-5b stark beschleunigt und sie somit Eigenschaften von Motoren mit niedriger *duty ratio* aufweisen. Durch Ermittlung der Aktin-Bindungs- und Aktin-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in An- und Abwesenheit von ADP kann untersucht werden, ob die Mutation auch in einer geringeren Affinität von Myosin und Myosin-ADP zu Aktin resultiert.

Zur Bestimmung der Aktinbindungskonstante 2. Ordnung (k_{+A}) wurde Myosin mit steigenden Konzentrationen an Pyren-Aktin gemischt. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen können mit

Exponentialfunktionen 1. Ordnung beschrieben werden. Die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} gegen die Pyren-Aktinkonzentration zeigt einen linearen Verlauf, dessen Steigung k_{+A} entspricht (s. Abb. 24 (A)).

Die Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktin aus dem Akto-Myosin- bzw. Akto-Myosin-ADP-Komplex wurde durch Verdrängung von Pyren-Aktin mit einem Überschuss an unmarkiertem F-Aktin gemessen. Wie in Abb. 24 (B) dargestellt, folgt der beobachtete Fluoreszenzanstieg einer Exponentialfunktion, deren Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von ADP (k_A) bzw. in Anwesenheit von 1 mM ADP (k_{DA}) entspricht.

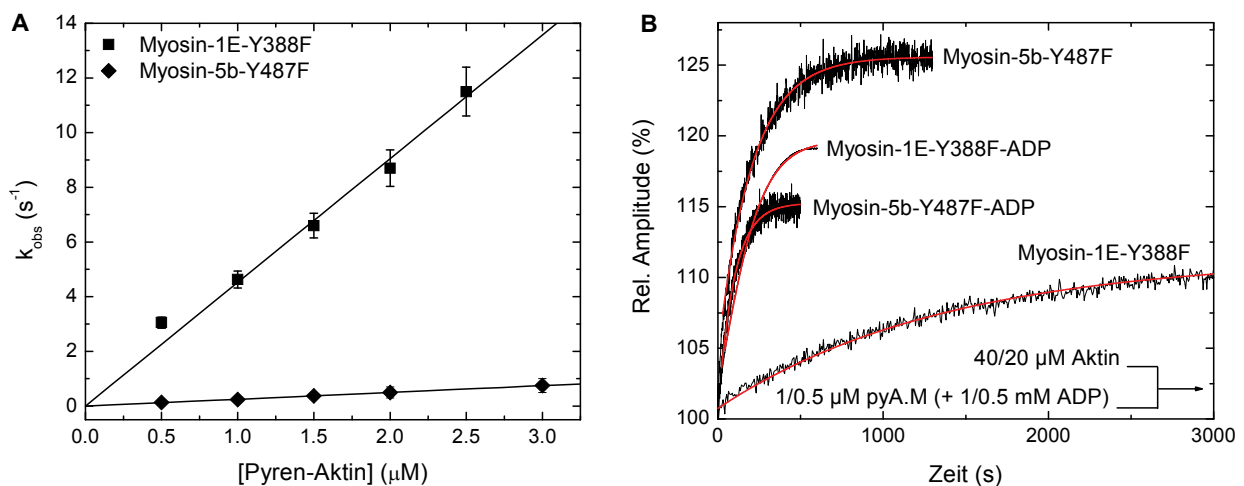


Abb. 24: Interaktion von Myosin mit Aktin. **(A)** Ermittlung der Aktinbindungskonstanten 2. Ordnung von Myosin-1E-Y388F sowie Myosin-5b-Y487F. 1 μM Myosin wurde mit steigenden Konzentrationen an Pyren-Aktin gemischt. Die Auftragung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten gegen die Pyren-Aktinkonzentration weist einen linearen Verlauf mit der Steigung k_{+A} auf. **(B)** Bestimmung der Aktin-Dissoziationsgeschwindigkeit von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F in An- und Abwesenheit von ADP. Die Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Pyren-Akto-Myosin-Komplex resultiert in einem monophasischen Fluoreszenzanstieg mit der Geschwindigkeitskonstante k_A bzw. k_{DA} .

Aus den Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden die Aktin-Dissoziationsgleichgewichtskonstanten der Akto-Myosin-Komplexe (K_A) berechnet. Die Gleichgewichtskonstante der Aktin-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP (K_{DA}) sowie die apparente Aktinbindungskonstante 2. Ordnung des Myosin-ADP-Komplexes (k_{+DA}) wurden unter der Annahme der thermodynamischen Konsistenz kalkuliert. Tabelle 9 fasst die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin zusammen.

Tab. 9: Transientenkinetische Parameter der Interaktion von Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin

Konstante	Myosin-1E		Myosin-5b	
	Wildtyp	Y388F	Wildtyp [§]	Y487F
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$2.9 \pm 0.2^*$	4.2 ± 0.3	1.17 ± 0.08	0.25 ± 0.01
k_A (s^{-1})	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}^*$	$(1.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$	$(23 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(4.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$
K_A (nM)	$0.5 \pm 0.1^*$	0.4 ± 0.08	20 ± 2	20 ± 2
k_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	6.0 ± 0.8	4.1 ± 0.6	0.78 ± 0.06	0.57 ± 0.002
k_{DA} (s^{-1})	$(5.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$	$(5.1 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(30 \pm 3) \cdot 10^{-3}$	$(10 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
K_{DA} (nM)	$0.9 \pm 0.1^*$	1.3 ± 0.2	38.5 ± 5.1	17.6 ± 1.8

* DÜRRWANG et al. (2006)

§ TAFT et al. (2008)

Aus den Daten geht hervor, dass die Mutation in Schalter-2 die Interaktion der Myosine und ihrer ADP-Komplexe mit Aktin nur gering beeinflusst. Für Myosin-1E-Y388F weichen die ermittelten Parameter um einen Faktor kleiner 2 von Myosin-1E Wildtyp ab. Im Fall von Myosin-5b-Y487F sind sowohl k_{+A} als auch k_A um den Faktor 4 geringer, die Affinität des Myosins zu Aktin ist daher unverändert. In Anwesenheit von ADP führt eine leicht verlangsamte Aktin-Dissoziation zu einer um den Faktor 2 höheren Affinität des Myosin-ADP-Komplexes zu Aktin.

3.1.2 Kinetische Charakterisierung von *DdMyosin-1B-F387Y* und *DdMyosin-2-S456Y*

Die Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F hat gezeigt, dass das Tyrosin in Schalter-2 wesentlich die Interaktion der Myosine mit ADP beeinträchtigt. Die Mutanten sind durch eine, für Myosine mit niedriger *duty ratio* typische, schnelle und nicht durch freie Mg^{2+} -Ionen regulierte ADP-Dissoziation gekennzeichnet. Im den folgenden Kapiteln wird die kinetische Analyse des ATPase-Zyklus von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y beschrieben. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob die Einführung eines Tyrosins in Schalter-2 eines Klasse-1 Myosins bzw. eines Myosins der Klasse-2, welche sich beide durch eine niedrige *duty ratio* auszeichnen, in einer langsamen geschwindigkeitsbestimmenden und Mg^{2+} -sensitiven ADP-Abgabe der Akto-Myosin-ADP-Komplexe resultiert. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten weitere Einblicke in den molekularen Mechanismus von Myosinen mit niedriger bzw. hoher *duty ratio* geben.

3.1.2.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität von *Myosin-1B-F387Y* und *Myosin-2-S456Y*

Die Messung der ATPase-Aktivität von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y wurde in Ab- und Anwesenheit von F-Aktin durchgeführt. Abbildung 25 zeigt die Abhängigkeit der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität der beiden Mutanten von der Aktinkonzentration im Vergleich mit den Wildtyp-Myosinen. Die ermittelten Parameter k_{basal} , k_{cat} und K_{app} sind in Tab. 10 zusammengefasst.

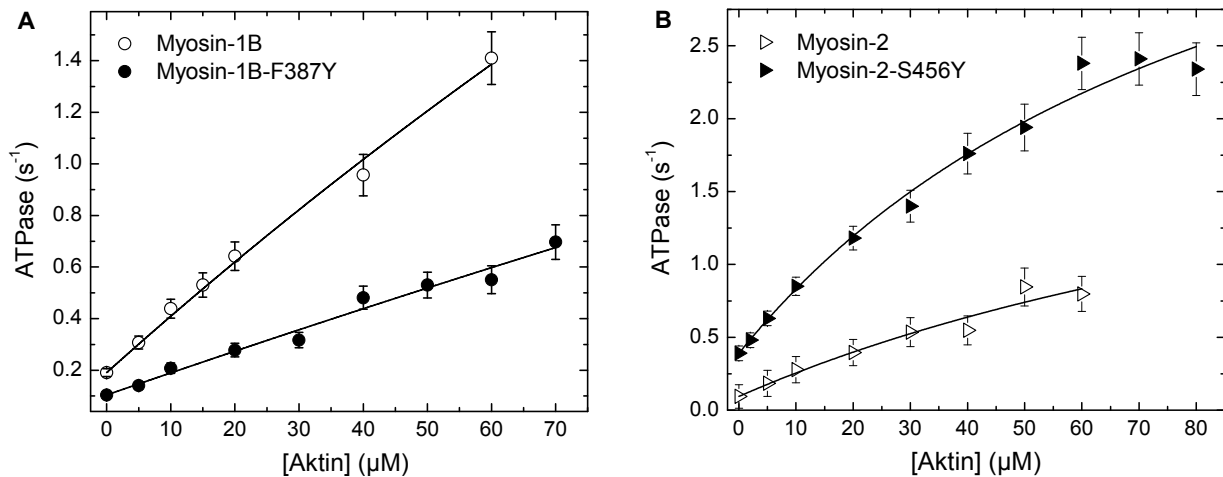


Abb. 25: ATPase-Aktivität von Myosin-1B-F387Y (A) und Myosin-2-S456Y (B) im Vergleich mit den Daten der Wildtyp-Myosine (TSIAVALIARIS et al., 2008; TAFT, 2007).

Tab. 10: Parameter der basalen und Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von Myosin

Konstante	Myosin-1B		Myosin-2	
	Wildtyp *	F387Y	Wildtyp [§]	S456Y
$k_{\text{basal}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.095 ± 0.01	0.39 ± 0.04
$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	3.1 ± 0.4	> 0.7	1.44 ± 0.4	4.6 ± 0.8
$K_{\text{app}} \text{ (}\mu\text{M)}$	96 ± 20	> 80	51 ± 23	94 ± 25
$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} \text{ (}\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	0.032 ± 0.006	0.01 ± 0.003	0.028 ± 0.002	0.049 ± 0.016

* TSIAVALIARIS et al. (2008)

§ TAFT (2007)

Die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität von Myosin-1B-Y387F weist einen annähernd linearen Verlauf auf. Eine genaue Bestimmung der maximalen ATP-Umsatzgeschwindigkeit (k_{cat}) sowie der apparenten Gleichgewichtskonstante (K_{app}) ist daher nicht möglich. Aufgrund einer um den Faktor 3 niedrigeren Aktinbindungskonstante 2. Ordnung in Anwesenheit von ATP ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0.01 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), welche als Steigung einer an die ATPase-Aktivität bei niedrigen Aktin-Konzentrationen angepassten Geraden ermittelt wurde, lässt sich ein Anstieg von K_{app} durch die Mutation vermuten. Für Myosin-2-S456Y wurden mit $k_{\text{basal}} = 0.39 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$ eine 4-fach höhere basale ATPase-Aktivität und eine 3-fach höhere maximale Aktin-aktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit bestimmt.

3.1.2.2 Transientenkinetische Analyse von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y

Die Ergebnisse der ATPase-Messung weisen auf eine deutliche Beeinflussung der ATPase-Aktivität von Myosin-1B und Myosin-2 durch die Mutation in Schalter-2 hin. Mithilfe einer transientenkinetischen Analyse der Mutanten entsprechend den mit Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob die Einführung eines Tyrosins in Schalter-2 von Myosin-1B und Myosin-2 in kinetischen Eigenschaften resultiert, die typisch für Myosine mit hoher *duty ratio* sind. Tabelle 11 fasst die ermittelten transientenkinetischen Parameter von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y zusammen.

Tab. 11: Transientenkinetische Parameter von Myosin-1B-F387Y und Myosin-2-S456Y im Vergleich mit den Daten der Wildtyp-Myosine

Konstante	Myosin-1B		Myosin-2	
	Wildtyp *	F387Y	Wildtyp	S456Y
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1.97 \pm 0.01^{\S}$	0.20 ± 0.01	$0.7 \pm 0.04^{\#}$	0.21 ± 0.01
$k_{+3} + k_{-3}$ (s^{-1})	$\sim 1000^{\S}$	-	$\sim 28^{\#}$	~ 35
$1/K_1$ (μM)	$> 350^{\S}$	-	$> 40^{\#}$	> 170
k_{+D} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1.2 \pm 0.3^{\S}$	$1.4 \pm 0.3^{\S}$	$0.76 \pm 0.04^{\S}$	$0.92 \pm 0.28^{\S}$
k_{-D} (s^{-1})	$0.7 \pm 0.03^{\S}$	1.26 ± 0.06	2.14 ± 0.25	1.10 ± 0.02
K_D (μM)	$0.40 \pm 0.10^{\S}$	1.13 ± 0.23	$2.8 \pm 0.2^{\#}$	1.2 ± 0.5
$\mathbf{K}_1\mathbf{k}_{+2}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1.11 \pm 0.03^{\S}$	0.26 ± 0.01	$0.57 \pm 0.04^{\#}$	0.026 ± 0.002
\mathbf{k}_{+2} (s^{-1})	$\sim 700^{\S}$	~ 800	$\sim 500^{\#}$	> 90
$1/\mathbf{K}_1$ (μM)	$\sim 650^{\S}$	~ 3000	$\sim 1000^{\#}$	> 3000
\mathbf{k}_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$4.95 \pm 0.5^{\S}$	$15 \pm 2^{\S}$	$0.76 \pm 0.09^{\S}$	$0.72 \pm 0.09^{\S}$
\mathbf{k}_{AD} (s^{-1})	233 ± 20	150 ± 13	138 ± 10	398 ± 33
$\mathbf{K}_i [\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$ (μM)	-	190 ± 30	-	530 ± 120
\mathbf{K}_{AD} (μM)	47 ± 5	10 ± 1	$182 \pm 28^{\#}$	556 ± 21
\mathbf{k}_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$1.1 \pm 0.2^{\S}$	0.9 ± 0.08	$0.8 \pm 0.01^{\#}$	0.46 ± 0.04
\mathbf{k}_A (s^{-1})	$(4.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-3}^{\S}$	$(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-3}^{\#}$	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$
\mathbf{K}_A (nM)	$4.3 \pm 1.0^{\S}$	$1.9 \pm 0.5^{\S}$	$3.1 \pm 0.5^{\#}$	$3.2 \pm 0.8^{\S}$
\mathbf{k}_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$0.03 \pm 0.004^{\S}$	$0.29 \pm 0.04^{\S}$	$0.14 \pm 0.01^{\#}$	$0.018 \pm 0.002^{\S}$
\mathbf{k}_{DA} (s^{-1})	$(17 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	$(4.9 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(11 \pm 1) \cdot 10^{-3}^{\#}$	$(27 \pm 3) \cdot 10^{-3}$
\mathbf{K}_{DA} (nM)	$530 \pm 100^{\S}$	$17 \pm 3^{\S}$	$79 \pm 14^{\#}$	$1480 \pm 110^{\S}$

* TSIAVALIARIS et al. (2008)

 \S TSIAVALIARIS et al. (2002) \S berechnet

Die Interaktion der Mutanten mit ATP ist in Ab- und Anwesenheit von F-Aktin stark beeinträchtigt. Im Vergleich zu den Wildtyp-Myosinen sind die Gleichgewichtskonstanten der ATP-Dissoziation ($1/K_1$) bzw. ($1/\mathbf{K}_1$) 3- bis 5-fach erhöht. Die apparenten Bindungskonstanten 2. Ordnung (K_1k_{+2}) bzw. ($\mathbf{K}_1\mathbf{k}_{+2}$) sinken um den Faktor 4 bis 22. Im Fall von Myosin-2-S456Y ist die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung des stark- in den schwach-Aktin-gebundenen Akto-Myosin-ATP-Komplex (\mathbf{k}_{+2}) um den Faktor 6 erniedrigt.

Die Mutation in Schalter-2 von Myosin-1B und Myosin-2 beeinflusst darüber hinaus die Wechselwirkung der Akto-Myosin-Komplexe mit ADP. Die ADP-Bindung an Akto-Myosin-1B-Y387F ist um den Faktor 3 zu $\mathbf{k}_{+AD} = 15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschleunigt, während Akto-Myosin-2-S456Y durch eine 3-fach schnellere ADP-Dissoziation ($\mathbf{k}_{AD} = 398 \text{s}^{-1}$) gekennzeichnet ist. Aufgrund der veränderten ADP-Bindungseigenschaften sind die Gleichgewichtskonstanten der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP um das 5-fache erniedrigt ($\mathbf{K}_{AD} = 10 \mu\text{M}$, s. Abb. 26 (A)) bzw. um den Faktor 3 erhöht ($\mathbf{K}_{AD} = 556 \mu\text{M}$, s. Abb. 26 (B)). Die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin (\mathbf{k}_{AD}) ist für beide Mutanten, im Unterschied zu den Wildtyp-Myosinen, von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen abhängig (s. Abb. 26 (C) und (D)). Eine Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}_{\text{frei}}]$ im Bereich von $40 \mu\text{M}$ bis 10mM führt zu einem Absinken von \mathbf{k}_{AD} um den Faktor 2,5. Aus den hyperbolischen Anpassungen gemäß

$$k_{-AD} = \frac{k_{\min} \cdot \frac{[Mg^{2+}]}{K_i} + k_{\max}}{\frac{[Mg^{2+}]}{K_i} + 1}$$

mit k_{\min} als ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei 0 mM $[Mg^{2+}_{\text{frei}}]$ und k_{\max} als ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei Sättigung mit freien Mg^{2+} -Ionen wurden apparente Inhibierungskonstanten von K_i $[Mg^{2+}_{\text{frei}}] = 190 \mu\text{M}$ für Akto-Myosin-1B-F387Y und K_i $[Mg^{2+}_{\text{frei}}] = 530 \mu\text{M}$ für Akto-Myosin-2-S456Y erhalten.

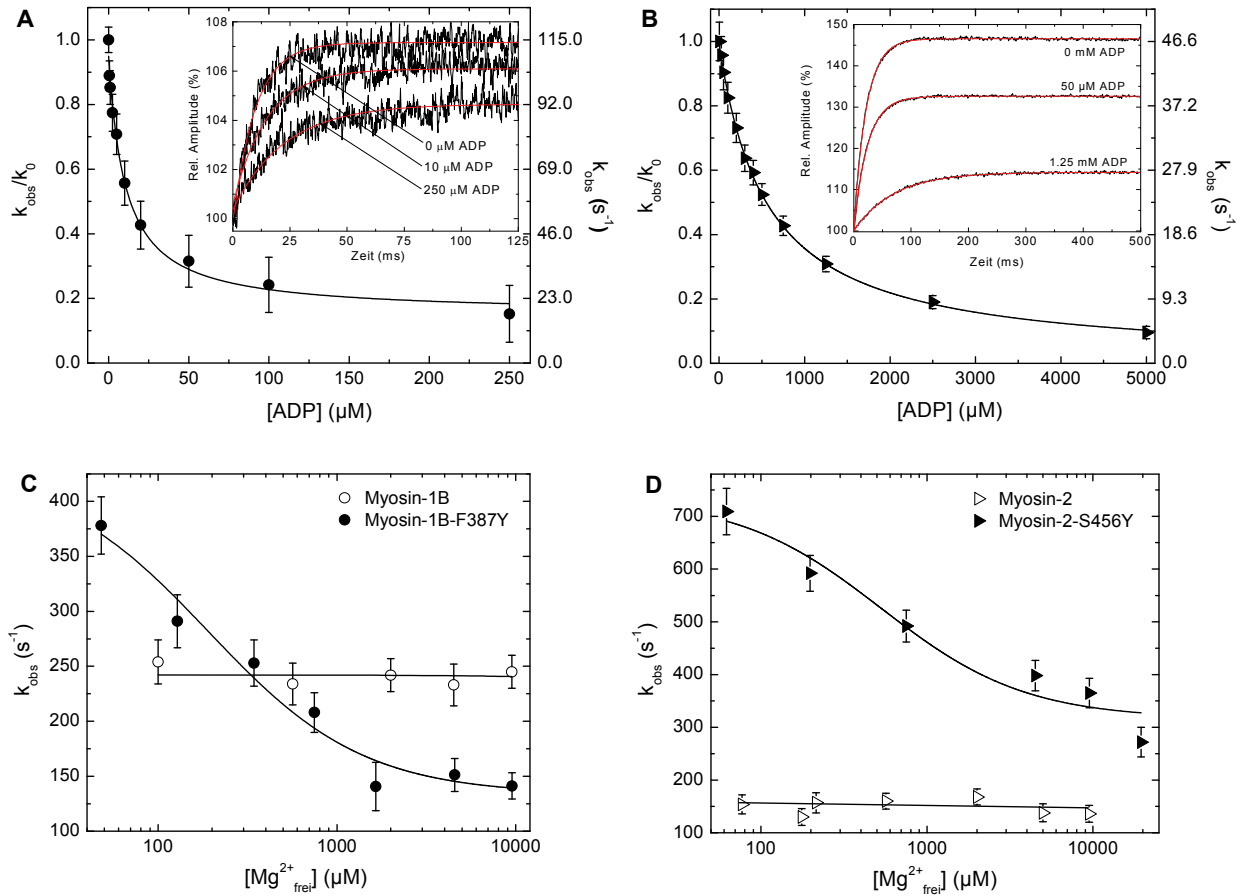


Abb. 26: Interaktion von Akto-Myosin mit ADP. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation (K_{AD}) von Akto-Myosin-1B-F387Y-ADP (A) und Akto-Myosin-2-S456Y-ADP (B). Die eingefügten Graphen zeigen drei monophasische Transienten bei verschiedenen ADP-Konzentrationen. Abhängigkeit der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{AD}) von Akto-Myosin-1B-F387Y (C) und Akto-Myosin-2-S456Y (D) von $[Mg^{2+}_{\text{frei}}]$ im Vergleich mit den Wildtyp-Myosinen.

Nur geringe Beeinträchtigungen weist die Wechselwirkung der Myosine mit Aktin auf. Myosin-1B-F387Y ist aufgrund einer verlangsamteten Aktin-Dissoziation durch eine 3-fach niedrigere Dissoziationsgleichgewichtskonstante $K_A = 1.9 \text{ nM}$ gekennzeichnet. Im Fall von Myosin-2-S456Y sind die kinetischen Parameter um einen Faktor kleiner 2 verändert.

Die Gleichgewichtskonstanten der Aktin-Dissoziation von Myosin-ADP (K_{DA}) sowie die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung der Bindung von Aktin an Myosin-ADP (k_{+DA}) wurden unter Verwendung der experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Aktin-Dissoziation von

Myosin-ADP (k_{DA}) berechnet. Es wurden Werte von $K_{DA} = 17 \mu\text{M}$ und $k_{+DA} = 0.29 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Myosin-1B-F387Y-ADP bzw. $K_{DA} = 1480 \mu\text{M}$ und $k_{+DA} = 0.018 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Myosin-2-S456Y-ADP erhalten. Die Affinität der Myosin-ADP-Komplexe zu Aktin ist damit im Vergleich zu den Wildtyp-Myosinen um den Faktor 30 höher bzw. um den Faktor 19 geringer. Dies beruht vor allem auf den stark veränderten Bindungsgeschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung (k_{+DA}).

3.1.3 Erstellung eines strukturellen Modells der Nukleotidbindungstasche von *DdMyosin-1E-Y388F*

Die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen kinetischen Parameter von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F weisen auf eine Beeinträchtigung der Interaktion von Myosin mit ADP und Mg^{2+} durch strukturelle Änderungen in der Nukleotidbindungstasche der Motoren hin. Um diese beschreiben zu können, wurde auf Basis der Kristallstruktur von *DdMyosin-1E-MgADP·VO₄* (KOLLMAR et al., 2002) ein atomares Modell von Myosin-1E-Y388F-MgADP·VO₄ erstellt. Dazu wurde Y388 *in silico* durch Phenylalanin ersetzt und die daraus resultierende Konformation der Schalter-2 Region durch Kraftfeldkalkulationen mithilfe des Programms „CNS Solve 1.0“ ermittelt. Entsprechend den Gesetzen der Molekülmechanik wurden dabei die Atome als Massepunkte betrachtet. Es wurde davon ausgegangen, dass sowohl Bindungslängen als auch Bindungswinkel Standardwerte einnehmen, welche jedoch durch intramolekulare Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen verändert werden können. In einem iterativen Verfahren wurde so durch Energieminimierung die energetisch günstigste dreidimensionale Struktur der Region berechnet. Das im Folgenden beschriebene Modell stellt die Effekte des Aminosäureaustauschs auf die Koordination von ADP und Mg^{2+} dar und erklärt die beobachteten Veränderungen der kinetischen Parameter.

In Myosin-1E Wildtyp besteht zwischen Y388 und L183 eine Wasserstoffbrückenbindung, die die Schalter-2 Region mit dem β_7 -Faltblatt der Myosin-Kernstruktur verknüpft. Durch den Austausch des Tyrosins zu Phenylalanin kann diese Wasserstoffbrückenbindung in Myosin-1E-Y388F nicht ausgebildet werden. Es kommt zu einer Verschiebung der Konformation von Schalter-2 in Richtung des Nukleotids. Infolgedessen wird die Koordinationsbindung von K107, einer Aminosäure der P-Schleife, zu ADP beeinträchtigt (s. Abb. 27 (A)).

Die veränderte Konformation von Schalter-2 beeinflusst auch die Koordination des Mg^{2+} -Ions. Die Mutation Y388F verursacht eine Annäherung von D386 (Schalter-2) an die Mg^{2+} -koordinierende Aminosäure T108 (P-Schleife), wodurch die zwischen den beiden Aminosäuren bestehende, schwache elektrostatische Wechselwirkung zu einer Wasserstoffbrückenbindung wird. Diese schwächt die Koordinationsbindung zwischen T108 und dem Mg^{2+} -Ion (s. Abb. 27 (B)). D386 ist außerdem durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Mg^{2+} -koordinierenden Wassermolekül verbunden. In Myosin-1E-Y388F existiert diese nicht mehr, so dass als Folge auch die Koordination des Mg^{2+} -Ions durch das Wassermolekül gestört ist.

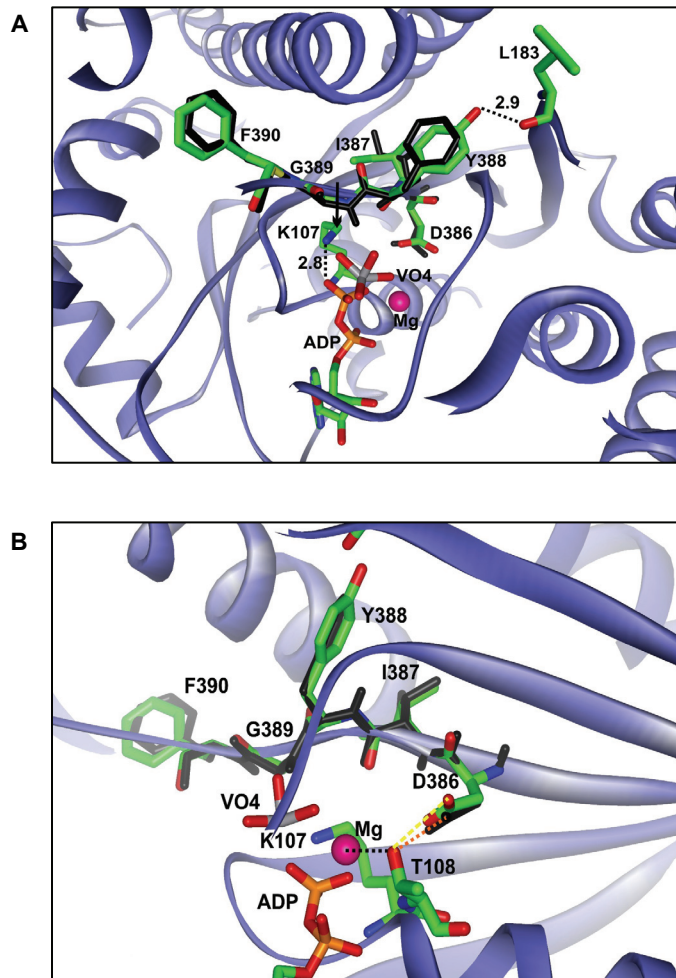


Abb. 27: Modell der Schalter-2 Region der Motordomäne von *DdMyosin-1E-Y388F*. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur der Motordomäne von *DdMyosin-1E* im Komplex mit dem Nukleotidanalogen $MgADP \cdot VO_4$ (KOLLMAR et al., 2002) (Schalter-2 Region von Myosin-1E: grün; Schalter-2 Region von Myosin-1E-Y388F: schwarz; Diphosphat-Anteil von ADP: orange; VO_4 : grau; Mg^{2+} : lila) **(A)** Einfluss der Mutation auf die Koordination von ADP. Zu sehen ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y388 (Schalter-2) und L183 (β_7 des 7-strängigen β -Faltblatts) in Myosin-1E Wildtyp, die in Myosin-1E-Y388F nicht ausgebildet werden kann. Der Pfeil zeigt die daraus resultierende Konformationsänderung der Schalter-2 Region in Richtung des Nukleotids. Es kommt zu einer Störung der ADP-Koordination durch K107 (P-Schleife). **(B)** Auswirkung der Mutation auf die Koordination von Mg^{2+} . Die veränderte Position von D386 (Schalter-2) führt zu der Umwandlung der schwachen elektrostatischen Wechselwirkung (gelb) zwischen D386 und T108 (P-Schleife) in eine Wasserstoffbrücke (orange), wodurch sich D386 und T108 annähern und die Koordinationsbindung von T108 zu Mg^{2+} gestört wird. Die Abbildungen wurden mit dem Programm „Pymol“ erstellt.

3.2 Darstellung eines künstlichen prozessiven Motors

Klasse-5 Myosine, die durch eine hohe *duty ratio* gekennzeichnet sind, führen in einem *hand-over-hand*-Mechanismus mehrere aufeinanderfolgende Schritte entlang eines Aktinfilaments aus, ohne von diesem zu dissoziieren (MEHTA et al., 1999; WALKER et al., 2000). Für die Beschreibung dieser prozessiven Bewegung werden verschiedene Modelle postuliert, welche die Koordination der beiden Köpfe des Myosins durch intramolekulare Spannung beschreiben (RIEF et al., 2000; VEIGEL et al., 2002; PURCELL et al., 2005). Die strukturellen, mechanistischen und kinetischen Parameter, die prozessive Bewegung ermöglichen, sind jedoch bis heute nicht vollständig bekannt.

Um die Voraussetzungen für prozessive Bewegung genauer definieren zu können, sollte in einem Struktur-basierten *Protein Engineering*-Ansatz ein Minimalmodell eines prozessiven Myosins aus vier molekularen Bausteinen entworfen werden. Als einziger natürlicher Bestandteil einer Myosinpolypeptidkette dient die Motordomäne von *DdMyosin-5b*. Für dieses Myosin wurde auf der Basis von kinetischen und funktionalen Studien an einem monomeren Konstrukt prozessives Verhalten postuliert (TAFT et al., 2008). Der künstliche Hebelarm „2R“, bestehend aus zwei Wiederholungen des α -Aktininproteins aus *D. discoideum* (ANSON et al., 1996), ersetzt die natürliche Nackendomäne mit den leichten Ketten. Eine spontane Dimerisierung des Moleküls wird durch den Leucin-Zipper des Transkriptionsfaktors GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae* erreicht („LZ“; O’SHEA et al., 1991). Den C-Terminus des Proteins bildet ein EYFP-Molekül, das Experimente zum Bewegungsverhalten des Myosins auf Einzelmolekülebene erlaubt.

Die funktionale Untersuchung dieses künstlichen dimeren Motors sollte zeigen, ob die Motordomäne eines Myosins allein die Fähigkeit zu prozessivem Verhalten bestimmt. Durch die Verwendung künstlicher Hebelarme können Fragen zur Notwendigkeit leichter Ketten für prozessive Bewegung und deren Einfluss auf den koordinierten Bewegungsablauf beantwortet werden. Die Experimente ermöglichen Rückschlüsse auf die Anforderungen an die mechanischen Eigenschaften der Nackendomänen für die Erzeugung intramolekularer Spannung, die die Bewegung der beiden Köpfe koordiniert. Ferner können Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die ADP-Freisetzung der beiden Motordomänen des dimeren Myosins durch intramolekulare Spannungen beeinflusst wird und wie freie Mg^{2+} -Ionen durch Modulation der ADP-Dissoziation die Prozessivität des Motors regulieren.

3.2.1 Struktur-basierte *in silico*-Konstruktion von *DdMyosin-5b-2R-LZ-EYFP*

Der *in silico*-Entwurf des künstlichen dimeren Myosins *DdMyosin-5b-2R-LZ-EYFP* basiert auf den bekannten Röntgenkristallstrukturen der *DdMyosin-2*-Motordomäne mit artifiziellem Hebelarm (M765-2R, Kliche et al., 2001) sowie des Leucin-Zippers GCN4. Mithilfe des Programms „Deep View Swiss-PdbViewer“ wurden diese Strukturen durch Überlagerung der α -helikalen C-Termini der Hebelarme (Aminosäuren I1000, E1001, D1002) und der ersten α -helikalen Aminosäuren des Leucin-Zippers (Aminosäuren M2, K3, Q4) so ausgerichtet, dass keine sterische Kollisionen der Motordomänen auftreten können. Durch Verknüpfung der Bestandteile nach K999 der M765-2R-Moleküle mit M2 des Leucin-Zippers wurde gewährleistet, dass die α -helikale Struktur nicht unterbrochen wird und die Ausrichtung der beiden Motordomänen flexibel genug ist, um die gleichzeitige Bindung an ein Aktin-Filament zu ermöglichen, ohne die Fähigkeit zur Übermittlung

intramolekularer Spannung zu verlieren. Die Analyse der intramolekularen Wechselwirkungen im so entstandenen dimeren Molekül zeigte eine Abstoßung der positiv geladenen Aminosäuren K999 (entspricht K1073 in dem fertigen künstlichen dimeren Myosin-5b-2R-LZ-EYFP) des einen sowie R996 (R1070) des anderen Strangs, die eine Dimerisierung des Moleküls verhindert hätte. Aus diesem Grund wurde K999 *in silico* zu Aspartat (D) mutiert. Es folgten Kraftfeldkalkulationen mithilfe des Programms „CNS Solve 1.0“. Dazu wurden die Positionen der Aminosäuren M1 bis L991 (L1065) sowie ab D1006 (D1079) fixiert und die Bewegung der Aminosäuren A992 (A1066), E993 (E1067), L1004 (L1077) und E1005 (E1078) durch harmonische Rückstellkräfte eingeschränkt. Die verbleibenden Aminosäuren, die den Übergang der Hebelarme zum Leucin-Zipper darstellen, waren frei beweglich. Die Berechnungen zur Minimierung der Potentialenergie des Moleküls gemäß den Gesetzen der Molekülmechanik zeigten nach 500 Iterationsschritten kein Auseinanderdriften der beiden Aminosäureketten, das entworfene dimere Molekül wurde daher als stabil eingestuft. Schließlich wurden die C-Termini des dimeren Proteins mit den N-Termini zweier EYFP-Moleküle verknüpft. Abbildung 28 (A) zeigt das Modell des dimeren M765-2R-LZ-EYFP-Moleküls. Der Übergang der Hebelarme in den Leucin-Zipper sowie die dort auftretenden stabilisierenden Interaktionen zwischen den beiden Polypeptidketten sind in Abb. 28 (B) dargestellt.

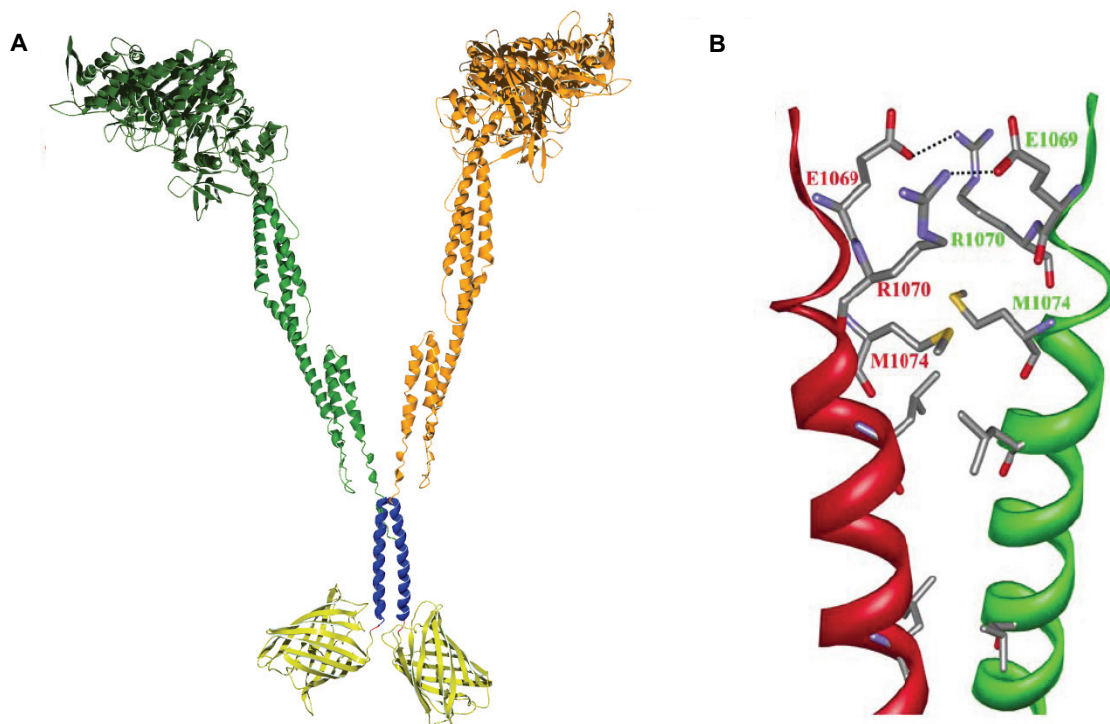


Abb. 28: (A) Modell eines künstlichen dimeren Myosins, bestehend aus den Kristallstrukturen der Motordomänen M765 von *DdMyosin-2* mit künstlichem Hebelarm „2R“ (grün, orange), dem Leucin-Zipper (blau) und den beiden C-terminalen EYFP-Molekülen (gelb). (B) Übergang zwischen dem künstlichen Hebelarm und dem Leucin-Zipper. Die beiden Polypeptidketten sind in rot bzw. grün dargestellt. Aminosäuren, die zu einer Interaktion zwischen den beiden Ketten beitragen, sind mit ihren Seitenketten abgebildet. Zwischen den Resten von E1069 (E995 in M765-2R) der einen und R1070 (R996 in M765-2R) der anderen Kette bilden sich stabilisierende Salzbrücken aus. Die Methionine M1074 (M2 des Leucin-Zippers) der beiden Polypeptidketten sind über hydrophobe Wechselwirkung verbunden. Die Abbildungen wurden mithilfe der Programme „Web Lab Viewer Lite“ und „POV-Ray“ erstellt.

3.2.2 Analytische Ultrazentrifugation und Nachweis prozessiver Bewegung von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP

Der Vektor zur Expression von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP wurde, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, dargestellt. Das Protein wurde in *D. discoideum* produziert und aufgereinigt. Mithilfe der analytischen Ultrazentrifugation konnte der Dimerisierungsstatus des Proteins überprüft werden. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Prof. Claus Urbanke (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Abbildung 29 (A) stellt die Auswertung eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs zur Bestimmung der Homogenität der Proteinlösung dar. Die Auftragung von $dc(s)/ds$ gegen $s_{20,w}$ zeigt, dass die Lösung nahezu ausschließlich eine Proteinspezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,w} = 7.4$ S enthält.

Zur Bestimmung der Molmasse dieser Spezies dienen Sedimentationsdiffusions-Gleichgewichtsläufe. In Abb. 29 (B) ist die Auftragung der Absorption bei 280 nm als Ausdruck für die Proteinkonzentration gegen die Entfernung zum Rotormittelpunkt bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 8000 rpm und 12000 rpm dargestellt.

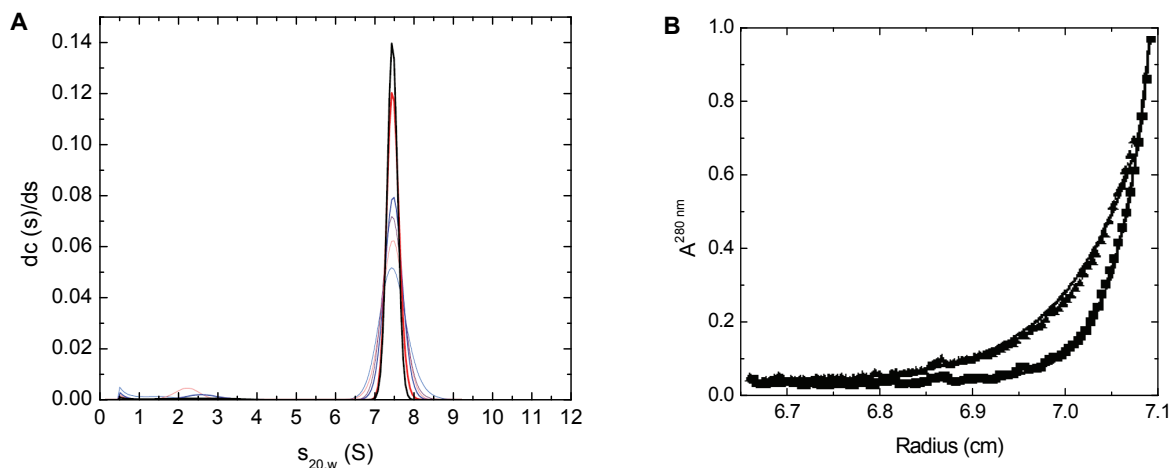


Abb. 29: Auswertung der Ultrazentrifugationsexperimente mit Myosin-5b-2R-LZ-EYFP. **(A)** s-Wert-Verteilung des Sedimentationslaufs. Die Breite der Verteilung nimmt mit der Zeit des Laufs ab. **(B)** Proteinkonzentrationsverteilung der Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsläufe. 1.7 μ M Myosin-5b-2R-LZ-EYFP in Ultrazentrifugationspuffer wurden bei 8000 rpm (\blacktriangle) und 12000 rpm (\blacksquare) bis zur Einstellung des Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts zentrifugiert. An die Konzentrationsverteilung wurden Exponentialkurven zur Bestimmung der Molmasse angepasst.

Die mithilfe des Programms „BPCFIT“ an die gemessenen Konzentrationsverteilungen angepassten Exponentialkurven bestimmen die Molmasse (M_w) zu 300 ± 12 kg/mol. Dieser Wert weist sehr gute Übereinstimmung mit dem aus der Aminosäurezusammensetzung berechneten Molekulargewicht eines dimeren Myosin-5b-2R-LZ-EYFP-Moleküls von $M_w = 307$ kg/mol auf. Aus den Ultrazentrifugationsexperimenten ergibt sich somit, dass das aufgereinigte künstliche Myosin Myosin-5b-2R-LZ-EYFP bei der eingesetzten Proteinkonzentration und den verwendeten Pufferbedingungen als homogenes Dimer vorliegt.

Die funktionale Charakterisierung von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP durch verschiedene Einzelmolekülmessungen mittels TIRF- (*Total Internal Reflection Fluorescence*)-Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Mamta Amrute-Nayak (Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. In einem Experiment auf Einzelmolekülebene

zum Bewegungsverhalten von Myosin (SAKAMOTO et al., 2000) konnte prozessive Bewegung von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP mit einer mittleren Geschwindigkeit von ~ 250 nm/s und einer mittleren Laufweite von ~ 700 nm beobachtet werden (s. Abb. 30). Die weiteren Ergebnisse der Analyse werden in Kapitel 4.2 diskutiert.

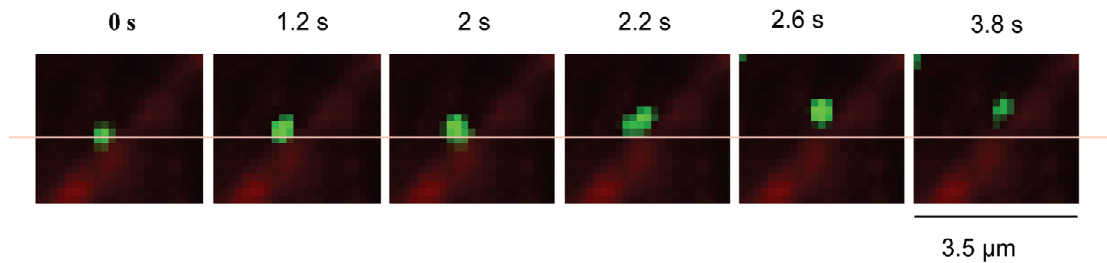


Abb. 30: Prozessives Laufverhalten von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP. Ein einzelnes Myosin-5b-2R-LZ-EYFP-Molekül (grün) bewegt sich prozessiv entlang eines Alexa 632-fluoreszenzmarkierten F-Aktinfilaments (rot) über eine Laufstrecke von ~ 700 nm (AMRUTE-NAYAK et al., nicht veröffentlicht).

3.3 Kinetische Charakterisierung eines Klasse-11 Myosins aus *Nicotiana tabacum*

Myosine der Klasse-11 fungieren als Vesikeltransporter in pflanzlichen Zellen und erzeugen die schnellste für Motorproteine bekannte Bewegung. Aufgrund der Instabilität isolierter Klasse-11 Myosine gibt es bis heute jedoch nur zu drei Myosinen dieser Klasse kinetische und funktionale Untersuchungen (TOMINAGA et al., 2003; HACHIKUBO et al., 2007; ITO et al., 2007). Es ist daher nicht eindeutig geklärt, ob diese Motoren in einem Ensemble nicht-prozessiver Myosine arbeiten oder sich einzeln prozessiv entlang eines Aktinfilaments fortbewegen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde eine detaillierte kinetische Charakterisierung des ATPase-Zyklus eines prozessiven Klasse-11 Myosins aus *Nicotiana tabacum* durchgeführt. Hierzu wurde das rekombinante monomere Konstrukt *NtMyosin-11-2R* verwendet, das sich aus der Motordomäne von *NtMyosin-11* (AS 1-740) und dem künstlichen Hebelarm „2R“ zusammensetzt. Die Analyse sollte zeigen, ob besondere Anpassungen kinetischer Parameter die zugleich schnelle und prozessive Bewegung dieses Klasse-11 Myosins erklären können. Der Vergleich der erhaltenen Daten mit den kinetischen Eigenschaften der Motordomäne von *C. corallina* Myosin-11 (*CcMyosin-11-MD*), das gemäß einer von ITO et al. (2007) durchgeführten Studie einen nicht prozessiven Motor darstellt, kann Aufschluss darüber geben, welcher kinetische Mechanismus der postulierten prozessiven Bewegung von *NtMyosin-11* zugrunde liegt.

3.3.1 Aufreinigung des rekombinanten Myosinkonstrukts *NtMyosin-11-2R*

Das Plasmid zur Expression von *NtMyosin-11-2R* in *D. discoideum* wurde im Zusammenarbeit mit Kazuhiro Oiwa (Kobe Advanced ICT Research Center, Kobe, Japan) generiert. Gemäß der Methode von MANSTEIN und Hunt (1995) aufgereinigtes Myosin verlor binnen Stunden seine Motoraktivität. Um die Stabilität des Proteins zu erhöhen, wurde das Aufreinigungsprotokoll optimiert. Eine gewisse Stabilisierung konnte durch Zugabe von 3 % (w/v) Trehalose zu allen Puffern sowie von 2 mM ATP zu den Puffern für die Ni^{2+} -Affinitätschromatographie sowie dem Dialysepuffer erreicht werden. Das Nukleotid wird durch das Myosin zu ADP umgesetzt und bleibt als solches in der Nukleotidbindungstasche gebunden. Dieser stabilisierende Effekt von ADP wird in der Literatur auch für andere Klasse-11 Myosine beschrieben (HACHIKUBO et al., 2007; KASHIYAMA et al., 2001). Um die Proteinstabilität während der Lagerung bei -80 °C zu gewährleisten, wurden der Proteinelösung weitere 10 % (w/v) Trehalose zugesetzt. Vor der Durchführung transientenkinetischer Experimente wurde das in der Lösung enthaltene ADP durch Zugabe von Apyrase abgebaut, da es die Interaktion des Myosins mit Nukleotiden und Aktin beeinflusst.

3.3.2 Analyse der ATPase-Aktivität von *NtMyosin-11-2R*

Die Bestimmung der basalen und Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von *NtMyosin-11-2R* wurde, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Durch eine ATP-Titration mit dem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer konnte die genaue Konzentration an aktivem Myosin, welche in die Berechnung der ATPase-Aktivität eingeht, ermittelt werden. Da das intrinsische Fluoreszenz-Signal beim Mischen von *NtMyosin-11-2R* mit ATP nur eine Amplitudenänderung kleiner 1 % zeigt, wurde die ATP-Titration mit mant-ATP durchgeführt. Dazu wurden 0.5 μM Myosin mit 15 nM mant-ATP gemischt und die Amplitude des erhaltenen Fluoreszenzanstiegs ermittelt. Die Messung wurde mit

steigenden Konzentrationen an mATP wiederholt. Dabei wurde ein Anstieg der relativen Amplitude der erhaltenen Transienten beobachtet (s. Abb. 31 (A)). Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit steigenden mATP-Konzentrationen eine größere Anzahl von Myosinmolekülen ein mATP-Molekül binden kann. Bei vollständiger Sättigung von Myosin mit mATP erreichte die relative Amplitude ein Plateau. Durch Anpassung zweier Geraden an eine Auftragung der relativen Amplituden gegen die mATP-Konzentration wurde die tatsächliche Konzentration an aktivem Myosin zu 36 nM bestimmt (s. Abb. 31 (B)).

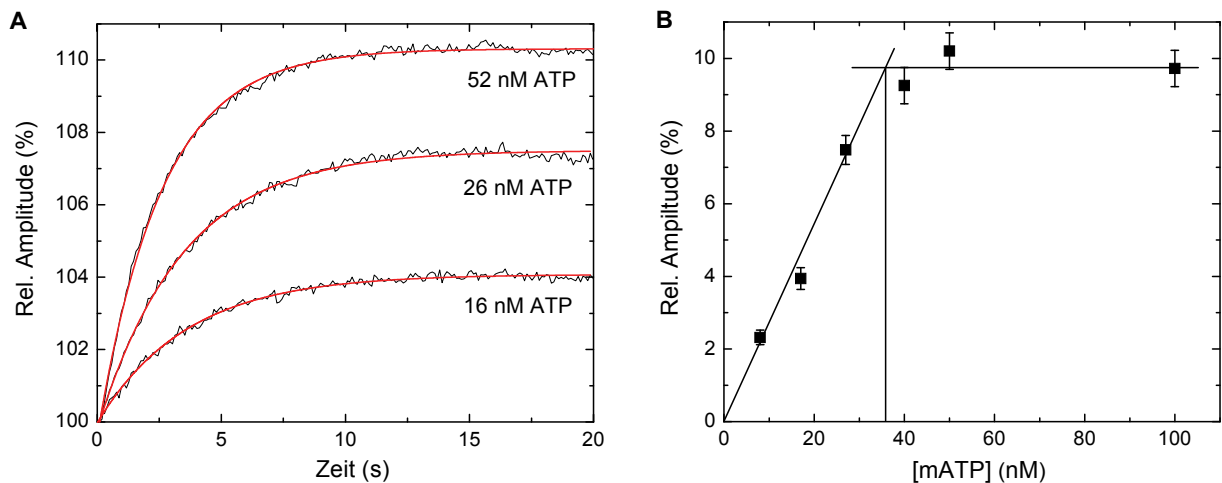


Abb. 31: ATP-Titration von *NtMyosin-11-2R*. **(A)** Die erhaltenen Transienten zeigen einen monophasischen Verlauf. **(B)** Die Anpassung zweier Geraden an die Auftragung der gemessenen Amplituden gegen die mATP-Konzentration bestimmt die Konzentration an aktivem Myosin zu 36 nM.

Damit ergibt sich zwischen der eingesetzten Proteinkonzentration und der Konzentration an tatsächlich aktiven Myosinmolekülen ein Faktor von 13,89. Mit diesem Faktor konnten die aus der ATPase-Analyse erhaltenen Daten angepasst werden. Abbildung 32 stellt die Abhängigkeit der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von *NtMyosin-11-2R* von der Aktinkonzentration dar. In Tab. 12 sind die kinetischen Parameter zusammengefasst und den Daten von *CcMyosin-11-MD* gegenübergestellt.

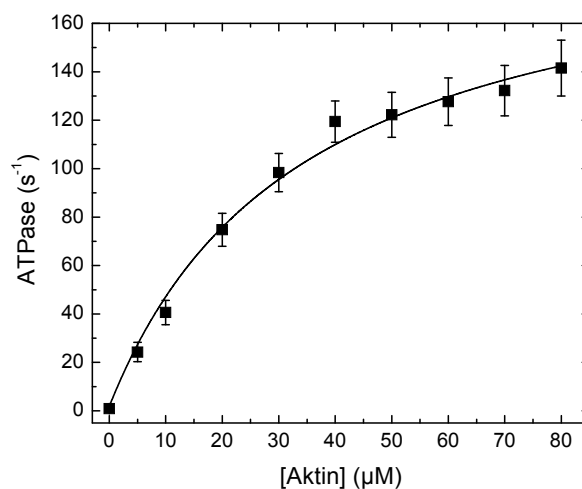


Abb. 32: Bestimmung der ATPase-Eigenschaften von *NtMyosin-11-2R* im Fließgleichgewicht. Es wurde die ermittelte ATPase-Aktivität gegen die eingesetzte F-Aktin-Konzentration aufgetragen.

Tab. 12: Parameter der ATPase-Aktivität von Myosin

Konstante	<i>Nt</i> Myosin-11-2R	<i>Cc</i> Myosin-11-MD*
	20 °C	25 °C
$k_{\text{basal}}(\text{s}^{-1})$	0.97 ± 0.08	0.59 ± 0.045
$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$	201 ± 11	390 ± 23
$K_{\text{app}}(\mu\text{M})$	34 ± 5	16 ± 1.6
$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}(\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	5.91 ± 0.45	24.4 ± 2.5

* ITO et al., 2007

Die beiden Klasse-11 Myosine unterscheiden sich nur geringfügig in den Parametern der ATPase-Aktivität. *Nt*Myosin-11-2R zeigt, vergleichbar mit *Cc*Myosin-11-MD, eine sehr hohe basale ATPase-Aktivität ($k_{\text{basal}} = 0.97 \text{ s}^{-1}$) sowie eine sehr schnelle maximale Aktin-aktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit ($k_{\text{cat}} = 201 \text{ s}^{-1}$). Die apparente Gleichgewichtskonstante (K_{app}) beträgt $34 \mu\text{M}$. Sie ist um den Faktor 2 größer, was einer niedrigeren Affinität zu Aktin in Anwesenheit von ATP entspricht. Mit einer Aktinbindungskonstante 2. Ordnung in Anwesenheit von ATP ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$) von $5.91 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ weist *Nt*Myosin-11-2R eine 5-fach niedrigere Kopplungseffizienz als *Cc*Myosin-11-MD auf.

3.3.3 Transientenkinetische Charakterisierung von *Nt*Myosin-11-2R

Im vorigen Kapitel wurde dargestellt, dass *Nt*Myosin-11-2R eine mit *Cc*Myosin-11-MD vergleichbare Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität aufweist. Die umfassende transientenkinetische Analyse von *Nt*Myosin-11-2R sollte zeigen, welche Parameter sich von *Cc*Myosin-11-MD unterscheiden und so eine hohe Population der stark-Aktin-bindenden Zustände während der ATP-Umsetzung ermöglichen, wie es für prozessive Myosine kennzeichnend ist.

3.3.3.1 Interaktion von *Nt*Myosin-11-2R und Akto-*Nt*Myosin-11-2R mit ATP

Durch die Analyse der Interaktion von Myosin bzw. Akto-Myosin mit ATP können die Hydrolysegeschwindigkeit des Myosins in Abwesenheit von Aktin ($k_{+3} + k_{-3}$) sowie die Geschwindigkeitskonstante k_{+2} der Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes ermittelt werden. Eine langsame Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes trägt unmittelbar zur Verlängerung des Aktin-gebundenen Zustands bei, während eine schnelle Hydrolyse, die vorwiegend im Aktin-ungebundenen Zustand stattfindet, eine schnelle Reassoziaton des Myosins an Aktin gewährleistet.

Die Geschwindigkeit der ATP-Bindung an *Nt*Myosin-11-2R wurde durch Messung der intrinsischen Fluoreszenz nach Zugabe eines Überschusses an ATP bestimmt. In Abb. 33 (A) ist der lineare Anstieg der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) zwischen 5 und 50 μM ATP dargestellt, dessen Steigung die ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung ($K_1 k_{+2}$) zu $0.88 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ definiert. Die Rückreaktion der Isomerisierung des Myosin-ATP-Komplexes wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_{-2} beschrieben. Diese ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Gerade zu 2.77 s^{-1} . Auch bei ATP-Konzentrationen bis 1 mM steigt k_{obs} linear an (s. Abb. 33 (B)). Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des *Nt*Myosin-11-2R-ATP-Kollisionskomplexes ($1/K_1$) ist demnach größer 1000 μM . Die maximale Geschwindigkeit der ATP-Bindung (k_{max}), die im Fall von

*Nt*Myosin-11-2R gemäß RITCHIE et al. (1993) die Hydrolysegeschwindigkeit ($k_{+3} + k_{-3}$) beschreibt, liegt weit über 1000 s^{-1} .

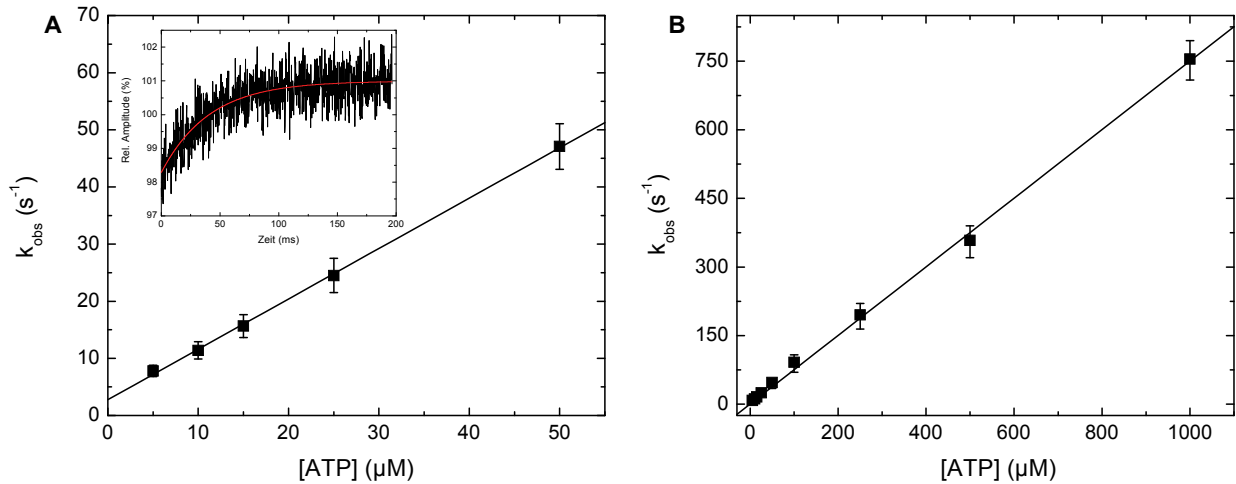


Abb. 33: Bindung von ATP an *Nt*Myosin-11-2R. **(A)** Die Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gegen ATP-Konzentrationen zwischen 5 und 50 μM zeigt eine lineare Abhängigkeit mit der Steigung K_1k_{+2} . Die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes k_2 wird durch den y-Achsenabschnitt der Gerade definiert. Der eingefügte Graph stellt die beobachtete monophasische Fluoreszenzänderung beim Mischen von 300 nM *Nt*Myosin-11-2R mit 50 μM ATP dar. **(B)** Auch bei Konzentrationen zwischen 50 und 1000 μM ATP steigen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten linear an.

Die Bindungsgeschwindigkeit von ATP an den Pyren-Akto-Myosin-Komplex ist durch den exponentiellen Anstieg der Pyren-Fluoreszenz ermittelbar, der aus der Dissoziation des Komplexes nach Zugabe eines Überschusses an ATP resultiert. Auf Basis der kinetischen Analyse von *Cc*Myosin-11-MD durch ITO et al. (2007) wurde vermutet, dass die ATP-induzierte Dissoziation des Akto-*Nt*Myosin-11-2R-Komplexes bei Raumtemperatur so hohe Geschwindigkeiten aufweist, dass sie mit dem *stopped-flow*-Spektrophotometer nicht beobachtet werden kann. Für diese Messung wurde die Temperatur der Umgebung daher auf 4.8 °C gekühlt, um die Reaktionsgeschwindigkeiten zu senken. Im Bereich von ATP-Konzentrationen kleiner 15 μM weisen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) einen linearen Anstieg mit der ATP-Bindungskonstante $K_1k_{+2} = 0.38 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$ als Steigung auf (s. Abb. 34 (A)). Der y-Achsenabschnitt der Gerade bestimmt die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion der Isomerisierung vom stark- in den schwach-Aktin-bindenden Akto-Myosin-ATP-Komplex (k_2) zu 0.53 s^{-1} . Bei ATP-Konzentrationen größer 15 μM folgen die beobachteten k_{obs} einem hyperbolischen Verlauf, aus dem die Geschwindigkeitskonstante k_{+2} zu $\sim 260 \text{ s}^{-1}$ sowie die Gleichgewichtskonstante der ATP-Dissoziation von Akto-*Nt*Myosin-11-2R-ATP ($1/K_1$) zu $\sim 1500 \text{ μM}$ ermittelt werden können (s. Abb. 34 (B)).

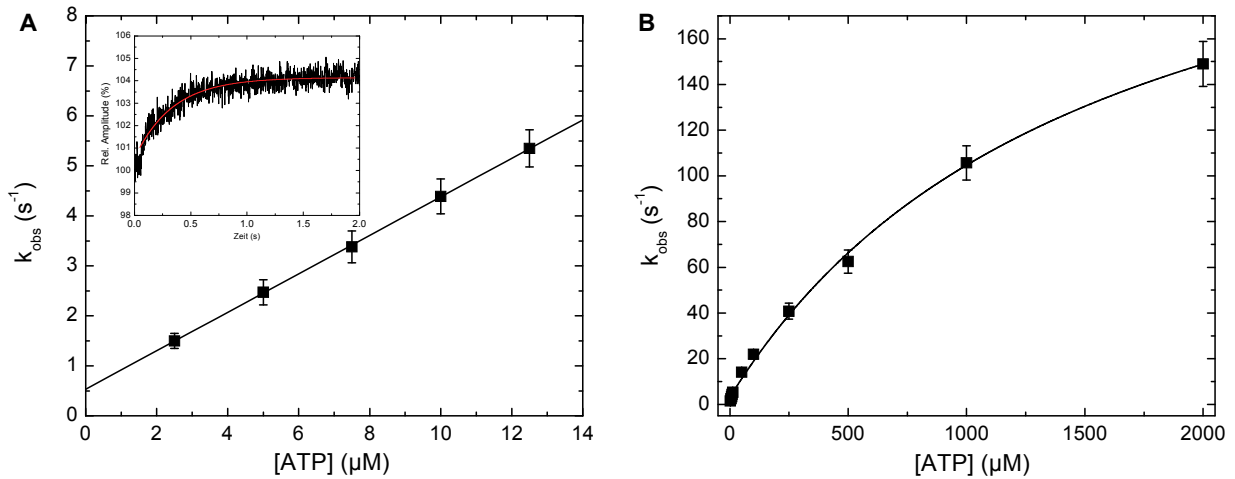


Abb. 34: ATP-induzierte Dissoziation von Pyren-Akto-*Nt*Myosin-11-2R bei 4.8 °C. **(A)** Die Geschwindigkeitskonstanten der an die Fluoreszenzänderungen angepassten Exponentialfunktionen 1. Ordnung zeigen im Bereich von [ATP] < 15 μM eine lineare Abhängigkeit mit der Steigung K_1k_{+2} . Der eingefügte Graph stellt die beim Mischen von 300 nM Pyren-Akto-*Nt*Myosin-11-2R mit 15 μM ATP beobachtete Fluoreszenzänderung dar. **(B)** Bei ATP-Konzentrationen > 15 μM kann der Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten mit einer Hyperbel beschrieben werden, aus der $1/K_1$ sowie k_{+2} ermittelt wurden.

Mithilfe einer *flash-photolysis*-Apparatur wurde die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}) der ATP-Bindung an Akto-*Nt*Myosin-11-2R bei 20 °C ermittelt. Die beobachteten Streulichtsignaländerungen folgen einem exponentiellen Abfall 1. Ordnung. In Abb. 35 wurden die Geschwindigkeitskonstanten der angepassten Exponentialfunktionen gegen die freigesetzte ATP-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Geraden entspricht $K_1k_{+2} = 0.78 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Der y-Achsenabschnitt definiert k_{-2} zu 1.17 s^{-1} .

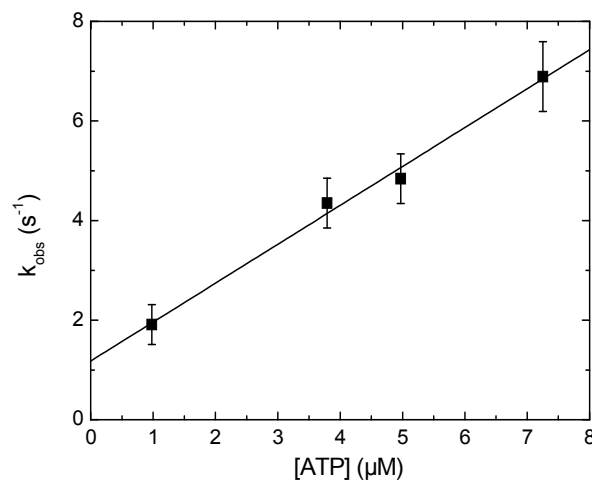


Abb. 35: Bestimmung von K_1k_{+2} mittels *flash-photolysis*-Methode. Die Geschwindigkeitskonstanten der monophasischen Lichtstreuungssignaländerungen wurden gegen die aus dem Absorptionssignal ermittelten ATP-Konzentrationen aufgetragen. Sie weisen eine lineare Abhängigkeit mit der Steigung K_1k_{+2} und dem y-Achsenabschnitt k_{-2} auf.

Tabelle 13 fasst die Daten der Interaktion von *Nt*Myosin-11-2R und Akto-*Nt*Myosin-11-2R mit ATP im Vergleich mit *Cc*Myosin-11-MD zusammen.

Tab. 13: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von ATP mit Myosin und Akto-Myosin

Konstante	<i>NtMyosin-11-2R</i>		<i>CcMyosin-11-MD*</i>	
	4.8 °C	20 °C	4.8 °C	25 °C
$K_1 k_{+2}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	-	0.88 ± 0.01	-	10
$(k_{+3} + k_{-3})$ (s^{-1})	-	> 1000	-	-
k_{-2} (s^{-1})	-	2.77 ± 0.36	-	-
$1/K_1$ (μM)	-	> 1000	-	-
$K_1 k_{+2}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0.38 ± 0.003	0.78 ± 0.02	-	4.1 ± 0.1
k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	~ 260	-	~ 400	~ 2600
k_{-2} (s^{-1})	0.53 ± 0.11	1.17 ± 0.31	-	-
$1/K_1$ (μM)	~ 1500	-	-	630

* ITO et al. (2007)

NtMyosin-11-2R bzw. Akto-*NtMyosin-11-2R* weisen, verglichen mit *CcMyosin-11-MD*, eine 11-fach bzw. 5-fach kleinere Bindungskonstante 2. Ordnung für ATP auf. Die Geschwindigkeit der Isomerisierung von Akto-*NtMyosin-11-2R*-ATP beträgt bei 4 °C $k_{+2} \sim 260 \text{ s}^{-1}$ und ist um den Faktor 1.5 langsamer als im Fall von *CcMyosin-11-MD*. Neben der niedrigen Affinität zu ATP sind *NtMyosin-11-2R* und Akto-*NtMyosin-11-2R* durch eine reversible Isomerisierung des Komplexes mit ATP gekennzeichnet. Dies zeigen die Geschwindigkeitskonstanten k_{-2} und k_{+2} , die zu 2.77 s^{-1} bzw. 1.17 s^{-1} bestimmt wurden. Mit einer Geschwindigkeit weit über 1000 s^{-1} verläuft die ATP-Hydrolyse von *NtMyosin-11-2R* sehr schnell.

3.3.3.2 Interaktion von *NtMyosin-11-2R* und Akto-*NtMyosin-11-2R* mit ADP

Die Koordination der prozessiven Bewegung von Myosinen basiert auf der synchronisierenden Wirkung intramolekularer Spannungen in den dimeren Molekülen (ROSENFELD und Sweeney, 2004; SWEENEY et al., 2007). Im Fall von Klasse-5 Myosinen modulieren diese die Affinität der beiden Köpfe zu ADP, sodass sich der hintere Kopf vom Aktin-Filament lösen und die nächste Aktin-Bindungsstelle aufsuchen kann, während der vordere Kopf als ADP-Komplex stark an Aktin gebunden bleibt und die Dissoziation des Moleküls verhindert. Einen Hinweis auf die Existenz dieser beiden Myosin-ADP-Zustände kann die Untersuchung der Wechselwirkung von *NtMyosin-11-2R* mit ADP in Ab- und Anwesenheit von Aktin liefern.

Die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+D}) für *NtMyosin-11-2R* wurde unter Verwendung von mant-ADP bei einer Reaktionstemperatur von 9.7 °C bestimmt. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen weisen einen biphasischen Verlauf auf. Wie in Abb. 36 (A) dargestellt, zeigen die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten ADP-Konzentration mit der Steigung $k_{+D} = 83.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate wurde die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation ermittelt, sie beträgt $k_{-D} = 218 \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase der mADP-Bindung weisen keine Abhängigkeit von der eingesetzten ADP-Konzentration auf, sie liegen im Mittel bei $28.2 \pm 8.3 \text{ s}^{-1}$.

Für die direkte Ermittlung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-D} bei 9.7 °C und 20 °C wurde der *NtMyosin-11-2R*-mADP-Komplex mit einem Überschuss an ATP gemischt. Dabei zeigt sich

ein sehr schneller Abfall der extrinsischen Fluoreszenz von mADP (Abb. 36 (B)). Die Anpassung von Exponentialkurven 1. Ordnung ergibt als Geschwindigkeitskonstante $k_{-D} = 405 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C und $k_{-D} = 220 \text{ s}^{-1}$ bei 9.7°C . Letztere zeigt damit gute Übereinstimmung mit dem aus dem y-Achsenabschnitt der ADP-Bindungstiteration erhaltenen Wert von $k_{-D} = 218 \text{ s}^{-1}$ der schnellen Phase.

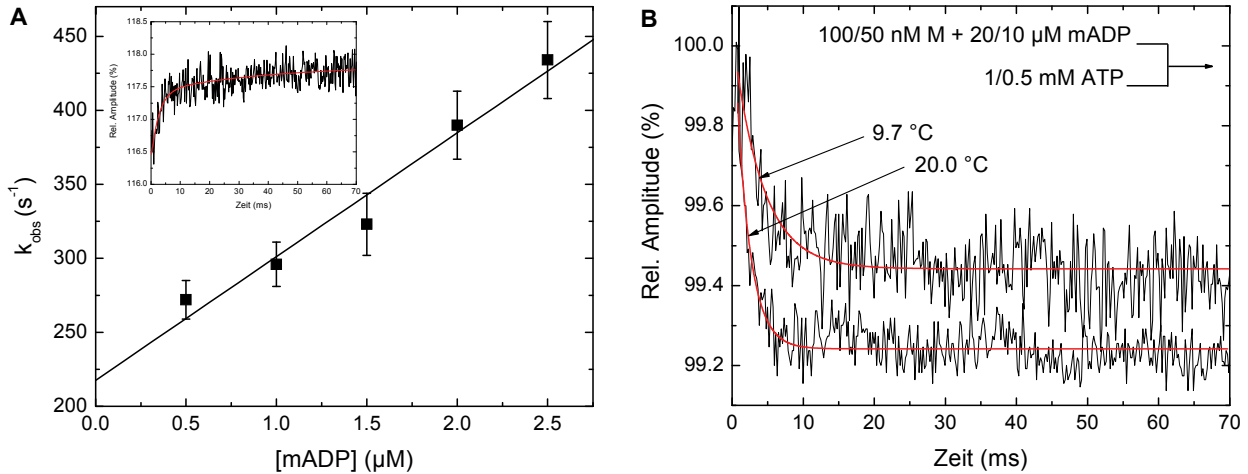


Abb. 36: Interaktion von *NtMyosin-11-2R* mit ADP. **(A)** ADP-Bindung an *NtMyosin-11-2R* bei 9.7°C . An die Fluoreszenzänderungen wurde die Summe zweier Exponentialfunktionen angepasst. Die Geschwindigkeitskonstanten der ersten Phase zeigen eine lineare Abhängigkeit von der ADP-Konzentration mit der Bindungskonstante 2. Ordnung für ADP (k_{+D}) als Steigung. Der eingefügte Graph stellt die Fluoreszenzänderung der Reaktion von 300 nM *NtMyosin-11-2R* mit 2.5 μM mADP dar. **(B)** Ermittlung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von *NtMyosin-11-2R* bei 9.7 und 20.0°C . An die beobachteten Fluoreszenzabnahmen wurden Exponentialfunktionen 1. Ordnung angepasst.

Aktin beschleunigt die Dissoziation von ADP für prozessive Myosine weniger stark als für nicht-prozessive Myosine. Dadurch wird dieser Reaktionsschritt im Falle prozessiver Motoren der Klassen 5, 6 und 7 geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus (DE LA CRUZ et al., 1999; DE LA CRUZ et al., 2001; HENN und De La Cruz, 2005). Die Verweildauer des Myosins am Aktinfilament ist erhöht und es kommt zu einer Stabilisierung des spannungssensitiven stark Aktin-bindenden Akto-Myosin-ADP-Zustands, der die oben beschriebene Koordination der beiden Myosinköpfe bei der prozessiven Fortbewegung des Motors ermöglicht. Die langsame Abgabe von ADP resultiert in der für prozessive Myosine typischen hohen Affinität des Akto-Myosin-Komplexes zu ADP.

Die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-*NtMyosin-11-2R* wurde durch Verdrängung von mADP aus dem Akto-Myosin-mADP-Komplex mit einem Überschuss an ATP bei 2.8 , 3.8 , 5.1 und 6.3°C ermittelt. Aus den angepassten Exponentialfunktionen 1. Ordnung ergeben sich Geschwindigkeitskonstanten (k_{AD}) von 279 s^{-1} , 323 s^{-1} , 433 s^{-1} sowie 503 s^{-1} . Abbildung 37 (A) zeigt die beobachteten monophasischen Fluoreszenzänderungen bei 2.8 und 6.3°C .

Die Temperaturabhängigkeit kinetischer Reaktionen wird durch die Arrhenius-Gleichung

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

k = Geschwindigkeitskonstante, A = Frequenzfaktor, E_A = Aktivierungsenergie, R = universelle Gaskonstante und T = absolute Temperatur,

beschrieben. Diese kann durch Logarithmieren in eine Gerade mit der Gleichung

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{1000 \cdot R} \cdot \frac{1000}{T}$$

umgewandelt werden. Um die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation von Akto-*Nt*Myosin-11-mADP bei 20 °C zu bestimmen, wurde dementsprechend der natürliche Logarithmus der gemessenen ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($\ln k_{AD}$) gegen $\left(\frac{1000}{T}\right)$ aufgetragen (s. Abb. 37 (B)). Unter der Annahme, dass sich die Aktivierungsenergie und der Frequenzfaktor in dem Temperaturbereich zwischen 6.3 °C und 20 °C nicht ändern (SIEMANKOWSKY et al., 1985), ergeben sich aus der angepassten Geraden mit der Gleichung

$$\ln k_{AD} = 53.4803 - 13.2007 \cdot \frac{1000}{T}$$

die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{AD} zu $\sim 4670 \text{ s}^{-1}$ bei 20 °C, der Aktivierungsfaktor zu 53.5 sowie die Aktivierungsenergie E_A der Reaktion zu 110 kJ/mol.

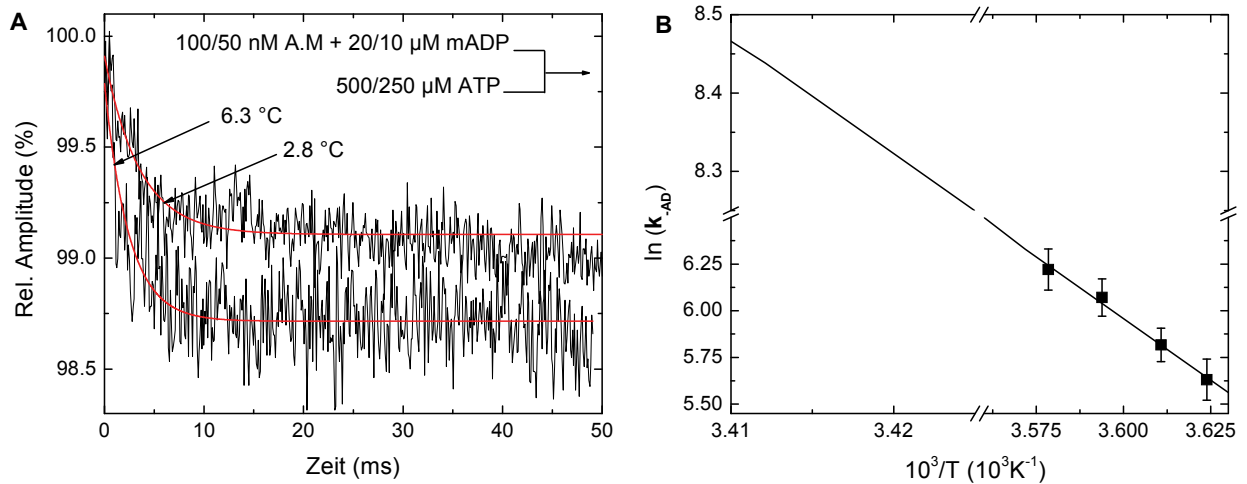


Abb. 37: ADP-Dissoziation von Akto-*Nt*Myosin-11-2R-ADP. **(A)** Monophasische Fluoreszenzänderungen beim Mischen des Akto-*Nt*Myosin-11-mADP-Komplexes mit einem Überschuss ATP bei 2.8 und 6.3 °C. **(B)** Temperaturabhängigkeit der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{AD} . Die Auftragung von $(\ln k_{AD})$ gegen $(10^3/T)$ weist einen linearen Verlauf auf. Die Schnittpunkt der Gerade mit der y-Achse bei $10^3/(293.15 \text{ K})$ stellt $(\ln k_{AD})$ bei 20 °C dar.

Unter der Annahme der thermodynamischen Konsistenz sowie einer geringen Temperaturabhängigkeit von K_D (MILLAR und Geeves, 1983) lässt sich die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation von Akto-*Nt*Myosin-11-ADP (K_{AD}) aus den Werten von K_A , K_{DA} sowie K_D (9.7 °C) zu $K_{AD} = 49 \text{ µM}$ berechnen. Aus K_{AD} und k_{AD} ergibt sich die Bindungsgeschwindigkeit von ADP an Akto-*Nt*Myosin-11-2R zu $k_{+AD} = 95 \text{ µM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Interaktion von *Nt*Myosin-11-2R und Akto-*Nt*Myosin-11-2R mit ADP sind in Tab. 14 zusammengefasst und den Daten von *Cc*Myosin-11-MD gegenübergestellt.

Tab. 14: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Myosin und Akto-Myosin mit ADP

Konstante	<i>NtMyosin-11-2R</i>		<i>CcMyosin-11-MD*</i>
	9.7 °C	20 °C	25 °C
k_{+D} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) 9.7°C	84 ± 11	-	1.9 ± 0.2
k_{+isom} (s^{-1})	28.2 ± 8.3	-	-
k_{-D} (s^{-1})	220 ± 23	406 ± 38	2.7 ± 0.4
K_D (μM)	2.6 ± 0.6	-	1.4 ± 0.2
k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	-	95 ± 11	10.8
k_{-AD} (s^{-1})	-	4700 ± 1000	~ 2800
K_{AD} (μM)		49 ± 17	260 ± 39

* ITO et al. (2007)

NtMyosin-11-2R ist durch sehr hohe Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten von ADP gekennzeichnet. Im Vergleich zu *CcMyosin-11-MD* dissoziiert ADP aus dem Myosin-ADP-Komplex mit $k_{-D} = 406 \text{ s}^{-1}$ 150-mal schneller. Auch die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung liegt trotz der niedrigeren Temperatur, bei der das Experiment durchgeführt wurde, um den Faktor 44 höher. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des *NtMyosin-11-2R*-ADP-Komplexes (K_D) ist somit nur geringfügig größer. Die zweite, ADP-konzentrationsunabhängige Phase der ADP-Bindung weist auf die Existenz zweier Myosin-ADP-Zustände, wie sie für prozessives Myosin-5 berichtet wird (ROSENFELD und Sweeney, 2004), und damit auf eine Isomerisierung des Myosin-ADP-Komplexes entsprechend dem in Kapitel 3.1.1.2.2.1 beschriebenen Schema der Interaktion von Myosin mit ADP hin.

Darüber hinaus zeigt die Gegenüberstellung der Daten, dass die Aktin-Komplexe beider Klasse-11-Myosine eine sehr hohe ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit aufweisen, dieser Reaktionsschritt ist demnach nicht geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus. Aktin beeinflusst die Interaktion von *NtMyosin-11-2R* mit ADP jedoch deutlich weniger, als dies für *CcMyosin-11-MD* der Fall ist. So wird die ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit *CcMyosin-11-MD* durch Aktin um den Faktor 1000, für *NtMyosin-11-2R* jedoch aufgrund der bereits schnellen ADP-Dissoziation in Abwesenheit von Aktin lediglich um den Faktor 10 beschleunigt. Die ADP-Bindungsgeschwindigkeit von *NtMyosin-11-2R* wird von Aktin nur in geringem Maß beeinflusst. Verglichen mit *CcMyosin-11-MD* ist sie allerdings um den Faktor 9 höher. Diese Unterschiede resultieren in einer 5-fach kleineren Gleichgewichtskonstante der Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Akto-*NtMyosin-11-2R* ($K_{AD} = 49 \mu\text{M}$) im Vergleich zu *CcMyosin-11-MD*. Die ermittelte Aktivierungsenergie der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-*NtMyosin-11-2R* von $E_A = 110 \text{ kJ/mol}$ ist mit dem von ITO et al. (2007) für *CcMyosin-11-MD* bestimmten Wert von $E_A = 84 \text{ kJ/mol}$ vergleichbar. Dies weist auf ähnlichen Mechanismus der ADP-Freisetzung der beiden Myosine hin.

3.3.3.3 Interaktion von *NtMyosin-11-2R* und *NtMyosin-11-2R*-ADP mit F-Aktin

Prozessive Myosine weisen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ADP eine hohe Affinität zu Aktin auf. Dadurch wird gewährleistet, dass das dimere Molekül mit einem Kopf trotz des gebundenen ADP-Moleküls nicht vom Aktin-Filament dissoziiert, während sich der zweite Kopf zur nächsten Aktinbindungsstelle fortbewegt (DE LA CRUZ et al., 1999). Die Aktin-Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von Myosin (K_A) und Myosin-ADP (K_{DA}) können aus den Aktin-Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten berechnet werden.

Zur Bestimmung der Aktinbindungskonstante 2. Ordnung k_{+A} wurde *Nt*Myosin-11-2R mit steigenden Aktin-Konzentrationen gemischt. Da bei der Bindung von Pyren-Aktin an *Nt*Myosin-11-2R bei Raumtemperatur keine extrinsische Fluoreszenzänderung beobachtet werden konnte, wurde die Lichtstreuungszunahme bei 405 nm durch die Bildung des Akto-*Nt*Myosin-11-2R-Komplexes gemessen. Die Transienten können mit einer Funktion beschrieben werden, die sich aus einer Exponentialfunktion und einer Geraden zusammensetzt (s. Abb. 38 (A), eingefügter Graph). Während der exponentielle Anstieg auf die Ausbildung des Akto-Myosin-Komplexes zurückzuführen ist, weist die zusätzliche Gerade auf einen weiteren Prozess, etwa die Verknüpfung von Aktinfilamenten durch Bündelung der C-terminalen His-tags von *Nt*Myosin-11-2R, hin. In Abb. 38 (A) wurden die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) der Exponentialfunktionen gegen die F-Aktin-Konzentration aufgetragen. An die Daten wurde eine Gerade angepasst, deren Steigung k_{+A} zu $5.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ definiert. Entsprechend dieser Messung wurde auch die Aktinbindungskonstante 2. Ordnung in Anwesenheit von 1 mM ADP (k_{+DA}) zu $5.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt (s. Abb. 38 (A)).

Die Geschwindigkeitskonstanten der Aktin-Dissoziation von Akto-*Nt*Myosin-11-2R (k_A) und Akto-*Nt*Myosin-11-2R-ADP (k_{DA}) wurden ermittelt, indem Pyren-Aktin aus dem Pyren-Akto-Myosin-Komplex in Ab- bzw. Anwesenheit von ADP mit einem hohen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin verdrängt wurde. Abbildung 38 (B) zeigt die beobachteten Fluoreszenzänderungen. Die Geschwindigkeitskonstanten der angepassten Exponentialfunktionen 1. Ordnung betragen $k_A = 0.0014 \text{ s}^{-1}$ sowie $k_{DA} = 0.025 \text{ s}^{-1}$.

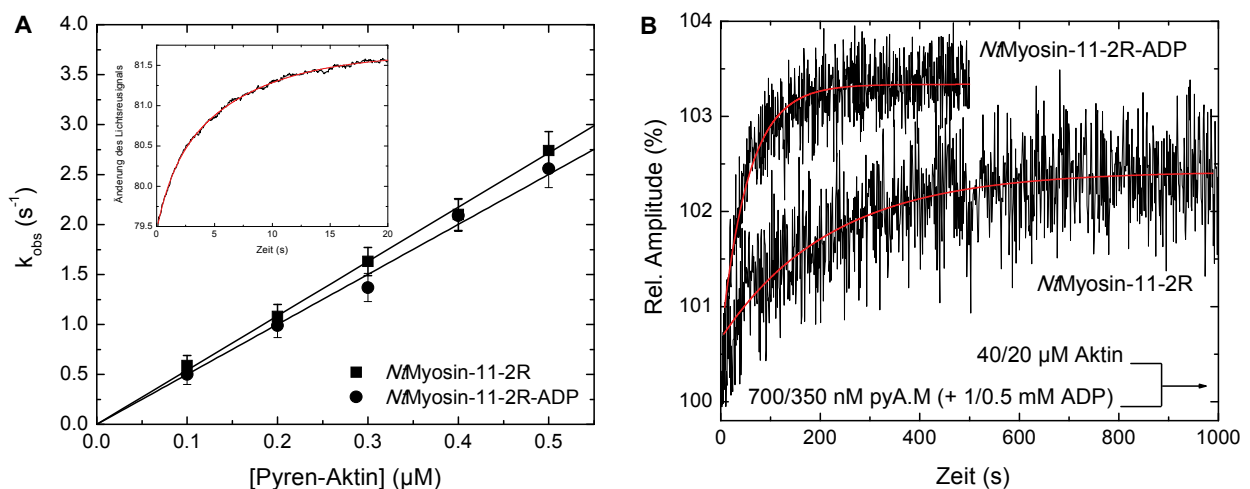


Abb. 38: Interaktion von *Nt*Myosin-11-2R und *Nt*Myosin-11-2R-ADP mit Aktin. **(A)** Ermittlung der Aktinbindungskonstanten 2. Ordnung k_{+A} und k_{+DA} durch Beobachtung der Änderung des Lichtstreuungssignals beim Mischen von *Nt*Myosin-11-2R mit steigenden F-Aktin-Konzentrationen in Ab- und Anwesenheit von ADP. Die Geschwindigkeitskonstanten der angepassten Exponentialfunktionen 1. Ordnung mit addierter Gerade zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Aktin-Konzentration mit der Steigung k_{+A} bzw. k_{+DA} . Der eingefügte Graph stellt die beim Mischen von 80 nM *Nt*Myosin-11-2R mit 200 nM F-Aktin erhaltene Streulichtsignaländerung dar. **(B)** Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Pyren-Akto-*Nt*Myosin-11-2R-Komplex mit unmarkiertem F-Aktin in Ab- und Anwesenheit von ADP. Die Geschwindigkeitskonstanten k_A und k_{DA} der Dissoziation wurden durch Anpassen von Exponentialfunktionen 1. Ordnung an die gemessenen Signaländerungen bestimmt.

Aus den Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten können die Aktin-Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von Akto-*Nt*Myosin-11-2R (K_A) und Akto-*Nt*Myosin-11-2R-ADP (K_{DA}) berechnet werden. Es wurden Werte von $K_A = 0.26 \text{ nM}$ und $K_{DA} = 4.9 \text{ nM}$ erhalten. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die ermittelten Gleichgewichts- und

Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion von *NtMyosin-11-2R* und *NtMyosin-11-2R*-ADP mit Aktin.

Tab. 15: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von *NtMyosin-11-2R* mit F-Aktin in An- und Abwesenheit von ADP

Konstante	<i>NtMyosin-11-2R</i>
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	5.4 ± 0.1
k_{-A} (s^{-1})	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$
K_A (nM)	0.26 ± 0.01
k_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	5.1 ± 0.1
k_{-DA} (s^{-1})	$(25 \pm 2) \cdot 10^{-3}$
K_{DA} (nM)	4.9 ± 0.1

Akto-*NtMyosin-11-2R* weist eine sehr kleine Dissoziationsgleichgewichtskonstante ($K_A = 0.26$ nM) auf, diese liegt im subnanomolaren Bereich. Die Anwesenheit von ADP führt zu einer Erhöhung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Akto-*NtMyosin-11-2R*-Komplexes um den Faktor 18 ($K_{DA} = 4.9$ nM). Dennoch ist auch die Affinität des *NtMyosin-11-2R*-ADP-Komplexes zu Aktin immer noch hoch.

KAPITEL IV

DISKUSSION

4.1 Aufklärung des molekularen Mechanismus einer Mg^{2+} -sensitiven ADP-Dissoziation von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen

Die Nukleotidbindungstasche in Myosinen wird durch die drei hochkonservierten Sequenzmotive P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 gebildet. Kristallographische Studien an *DdMyosin-2* im nukleotidfreien Zustand sowie im Komplex mit Nukleotiden oder Nukleotidanaloga haben gezeigt, dass die beiden Schalter-Regionen, abhängig von der Art des gebundenen Nukleotids, zwei verschiedene Konformationen annehmen können, die als „offen“ und „geschlossen“ bezeichnet werden (FISHER et al., 1995; GULICK et al., 1997; REUBOLD et al., 2003). Die Schalter-2-Region agiert als $P\gamma$ -Sensor und ist an der ATP-Hydrolyse und Produktfreisetzung beteiligt (SASAKI et al., 1998; FURCH et al., 1999). Sie ist durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit der *relay*-Helix und in Folge mit der Konverter-Region des Myosins verbunden. Dies ermöglicht die Koordination der Nukleotidumsetzung mit der Bewegung des Hebelarms (FISCHER et al., 2005). Schalter-2 spielt deshalb eine entscheidende Rolle in der Konvertierung der in ATP gespeicherten Energie in gerichtete Bewegung des Moleküls.

Kinetische Studien an *DdMyosin-1D*, *DdMyosin-1E*, *GgMyosin-5a* und *DdMyosin-5b* haben gezeigt, dass die Motoraktivität dieser Myosine durch Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen im physiologischen Bereich beeinflusst wird (FUJITA-BECKER et al., 2005; DÜRRWANG et al., 2006; HANNEMANN et al., 2005; TAFT et al., 2008). Niedrige Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen führen zu einer beschleunigten ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin und senken so den zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus (*duty ratio*), den die Myosine im stark-Aktin-gebundenen Akto-Myosin-ADP-Zustand verbringen. Dadurch ist dieser Schritt nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus der Myosine. Es wird daher vermutet, dass dieser Mechanismus durch Änderung der *duty ratio* die Funktion dieser Myosine als schnelle nicht-prozessive bzw. langsame, im Falle von Klasse-5 Myosinen prozessive, Motoren reguliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf Basis von Vergleichen der Aminosäuresequenz von Myosinen verschiedener Klassen und Organismen eine wesentliche Funktion von Schalter-2 und insbesondere einer nicht konservierten Aminosäure in dieser Region für die ADP-Freisetzung des Akto-Myosin-ADP-Komplexes, ihre Mg^{2+} -Sensitivität und in weiterer Folge für die *duty ratio* von Myosinen postuliert. Die Konsensussequenz der Schalter-2 Region (DIYGF_E) enthält im Fall der oben genannten Mg^{2+} -sensitiven Myosine mit hoher *duty ratio* ein Tyrosin, das sie von Myosinen

unterscheidet, die nicht durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert werden und durch eine niedrige *duty ratio* gekennzeichnet sind, wie *DdMyosin-1B* (DIFGFE) oder *DdMyosin-2* (DISGFE) (TSIAVALIARIS et al., 2008). Um den molekularen Mechanismus aufzuklären, der Mg^{2+} -sensitive Myosine mit hoher *duty ratio* von Myosinen mit niedriger *duty ratio* unterscheidet, wurde durch gezielte Mutation das Tyrosin in Schalter-2 von *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b* gegen Phenylalanin sowie das Phenylalanin bzw. Serin in *DdMyosin-1B* und *DdMyosin-2* gegen Tyrosin ersetzt. Die hergestellten Myosinmutanten wurden umfangreich kinetisch analysiert.

4.1.1 Das Tyrosin in Schalter-2 von *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b* ist für die hohe *duty ratio* der Motoren und ihre Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen notwendig

Um die Auswirkungen der Mutation in Schalter-2 von Myosin-1E und Myosin-5b zu untersuchen, wurde der ATPase-Zyklus von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F im Fließgleichgewicht sowie transientenkinetisch analysiert. Die ATPase-Parameter von Myosin-1E sind durch die Mutation (Y388F) nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu hat im Fall von Myosin-5b der Aminosäureaustausch eine deutlich verringerte Affinität des Myosins zu Aktin zur Folge. Dies spiegelt sich in der 6-fach kleineren Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP ($k_{cat}/K_{app} = 0.1 \mu M^{-1}s^{-1}$) von Myosin-5b-Y487F wieder.

Die transientenkinetische Analyse zeigt, dass die Affinität der Myosine zu ADP durch die Mutation für Myosin-1E um den Faktor 4 ($K_D = 25.8 \mu M$) und für Myosin-5b um den Faktor 20 ($K_D = 109 \mu M$) sinkt. Die Wildtyp-Myosine sind, wie verschiedene andere Myosine der Klassen 1 und 5 mit hoher Affinität zu ADP in Ab- und Anwesenheit von Aktin (z. B. GEEVES et al., 2000; ROSENFELD und Sweeney, 2004), durch eine biphasische ADP-Dissoziation gekennzeichnet, die auf die Existenz zweier fluoreszenzsensitiver Myosin-ADP-Zustände schließen lässt. Im Fall von Myosin-1E beschleunigt die Mutation in Schalter-2 sowohl die Abgabe von ADP als auch den vorgelagerten Isomerisierungsschritt um das 4-fache, was in der oben beschriebenen, geringeren Affinität von Myosin-1E-Y388F zu ADP resultiert. Myosin-5b-Y487F weist, im Gegensatz zu Myosin-5b Wildtyp, eine monophasische Fluoreszenzänderung der ADP-Dissoziation auf, die als 3-fach beschleunigte ADP-Abgabe interpretiert werden kann. Die 20mal geringere Affinität der Mutante Myosin-5b-Y487F zu ADP lässt darauf schließen, dass der Austausch des Tyrosins zu Phenylalanin im Fall von Myosin-5b auch die ADP-Bindung verlangsamt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Myosin-5b-Y487F ebenfalls durch eine zweiphasige ADP-Dissoziation gekennzeichnet ist und eine erste, schnellere Phase aufgrund der geringen Amplitude und des niedrigen Signal-Rauschverhältnisses der Fluoreszenzänderung nicht beobachtet werden konnte. Die beschriebenen Messungen zeigen damit, dass die Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin entsprechend der Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, wesentlich die ADP-Bindungseigenschaften der Motoren beeinträchtigt.

Auch in Anwesenheit von Aktin hat der Aminosäureaustausch eine Beschleunigung der ADP-Dissoziation von Myosin-1E und Myosin-5b zur Folge. Dies Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP steigt in Folge um den Faktor 7 ($K_{AD} = 81 \mu M$) bzw. 18 ($K_{AD} = 96 \mu M$). Darüber hinaus hat sich die Mg^{2+} -Sensitivität der beiden Myosine entscheidend verändert. Die Geschwindigkeit der Dissoziation von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex ist für beide Mutanten nicht mehr von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen abhängig.

Neben dieser spezifischen Störung der Interaktion der Myosine mit ADP sind nur wenige andere transientenkinetische Parameter durch die Mutation verändert. Die umfangreiche kinetische Charakterisierung von Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F weist somit darauf hin, dass das Tyrosin in Schalter-2 von Myosin-1E und Myosin-5b die Produktdissoziation und ihre Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen entscheidend beeinflusst.

Die stark beschleunigte ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP wirkt sich auch auf die *duty ratio* der Myosine aus. Diese beschreibt das Verhältnis des zeitlichen Anteils des ATPase-Zyklus, in dem Myosin stark an Aktin gebunden ist (T_{stark}), zur Gesamtdauer eines ATPase-Zyklus (T_{total}) und kann entsprechend

$$\text{duty ratio} = \frac{\frac{1}{k_{-AD}} + \frac{1}{k_{+2}}}{\frac{1}{k_{cat}}} = \frac{T_{stark}}{T_{total}}$$

k_{AD} : Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-Komplex; k_{+2} : Geschwindigkeit der Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes vom stark- in den schwach-Aktin-bindenden Zustand; k_{cat} : maximale Aktin-aktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit; T_{stark} : zeitlicher Anteil des ATPase-Zyklus, in dem Myosin stark an Aktin gebunden ist; T_{total} : Gesamtdauer eines ATPase-Zyklus

berechnet werden (ITO et al., 2007; WATANABE et al., 2006). Die *duty ratio* von *DdMyosin-5b* wandelt sich aufgrund der Mg^{2+} -regulierten Geschwindigkeitskonstante k_{AD} von 0.74 bei 5 mM [Mg^{2+}_{frei}] zu 0.23 bei 0.2 mM [Mg^{2+}_{frei}] (TAFT et al., 2008). Die Autoren konnten Fluktuationen der lokalen Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen im Millisekundenbereich in *D. discoideum*, vergleichbar zu HL60, HC11 und PC12 Zellen aus Mensch, Maus und Ratte (FARRUGGIA et al., 2006; SUZUKI et al., 2002), beobachten. Sie schließen aus den kinetischen und zellulären Studien, dass die Prozessivität von *DdMyosin-5b* und dadurch auch dessen Funktion durch freie Mg^{2+} -Ionen gesteuert wird. Ein ähnlicher Effekt auf die *duty ratio* ergibt sich aus der kinetischen Charakterisierung von *DdMyosin-1E* durch DÜRRWANG et al. (2006). Die *duty ratio* sinkt von 0.57 auf 0.29 bei den oben genannten Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen. Auch in dieser Studie wird eine Änderung der zellulären Funktion des Myosins in Abhängigkeit von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen postuliert.

Mit der Mutation des Tyrosins in Schalter-2 zu Phenylalanin verlieren beide Myosine die Mg^{2+} -Sensitivität. Die ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-Komplex wird nicht mehr durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen reguliert und ist schneller als die ADP-Dissoziation der Wildtyp-Myosine bei geringen Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen. Aus den kinetischen Daten ergibt sich die *duty ratio* von Myosin-1E-Y388F zu 0.11. Im Fall von Myosin-5b-Y487F ist die genaue Berechnung der *duty ratio* nicht möglich, da die maximale Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität des Myosins nicht bestimmbar ist. Myosin-5b Wildtyp und Mutante können jedoch verglichen werden, indem die ATPase-Aktivität der beiden Myosine bei 80 μ M Aktin zur Kalkulation herangezogen wird. Es ergeben sich so für Myosin-5b Wildtyp Werte von 0.57 bei 5 mM [Mg^{2+}_{frei}] bzw. 0.18 bei 0.2 mM [Mg^{2+}_{frei}]. Myosin-5b-Y487F weist unter dieser Annahme unabhängig von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen eine *duty ratio* von 0.06 auf. In Kooperation mit Falk Hartmann (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) ist es gelungen, die Veränderungen von Mg^{2+} -Sensitivität und *duty ratio* für Myosin-1E-Y388F und Myosin-5b-Y487F auch in funktionalen *in vitro*-Motilitätsmessungen

und *landing*-Experimenten zu bestätigen. Beide Myosine sind, unabhängig von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen, Motoren mit niedriger *duty ratio*.

Mit den beschriebenen kinetischen und funktionalen Analysen konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin in Schalter-2 von Myosin-1E und Myosin-5b zu der Generierung der hohen *duty ratio* dieser Motoren notwendig ist. Darüber hinaus beeinflusst die Aminosäure die Population der stark-Aktin-bindenden Myosinzustände, indem sie die Regulation der Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Akto-Myosin durch freie Mg^{2+} -Ionen vermittelt. Diese Arbeit lässt daher auch darauf schließen, dass ein Tyrosin in Schalter-2 Mg^{2+} -sensitives prozessives Verhalten von Klasse-5 Myosinen ermöglicht.

4.1.2 ***DdMyosin-1B-F387Y* ist durch eine hohe Affinität zu ADP und eine Mg^{2+} -sensitive Produktdissoziation gekennzeichnet**

Mit dem Austausch des Phenylalanins in Schalter-2 von *DdMyosin-1B* zu Tyrosin und der anschließenden kinetischen Charakterisierung der erzeugten Mutante *Myosin-1B-F387Y* sollte untersucht werden, ob ein Klasse-1 Myosin mit niedriger *duty ratio* durch die Einführung dieser Aminosäure in einen Mg^{2+} -sensitiven Motor mit hoher *duty ratio* vergleichbar mit *DdMyosin-1E* umgewandelt werden kann. Die Analyse sollte zeigen, wie die Schalter-2-Region die Verweildauer von Klasse-1 Myosinen in stark-Aktin-gebundenen Zuständen und ihre Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen beeinflusst und so weitere Einblicke in die molekulare Grundlage der *duty ratio* von Myosinen geben.

Aus der Charakterisierung der ATPase Eigenschaften von *Myosin-1B-F387Y* geht hervor, dass die Mutation Störungen im Ablauf des ATPase-Zyklus bewirkt. Die katalytische Effizienz des Myosins in Anwesenheit von Aktin, die durch die Aktinbindungskonstante 2. Ordnung (k_{cat}/K_{app}) beschrieben wird, sinkt um den Faktor 3 auf $0.01 \mu M^{-1}s^{-1}$. Eine genaue Bestimmung der apparenten Gleichgewichtskonstante (K_{app}) sowie der maximalen Aktin-aktivierten ATP-Umsatzgeschwindigkeit (k_{cat}) war daher nicht möglich. Es lässt sich vermuten, dass die Mutation eine veränderte Konformation von Schalter-2 zur Folge hat, die sich wesentlich auf die Wechselwirkung mit Nukleotid und Aktin auswirkt.

Die Beeinträchtigung der ATP-Umsetzung durch den Aminosäureaustausch wird durch die transientenkinetische Untersuchung von *Myosin-1B-F387Y* bestätigt. In einigen kinetischen Eigenschaften ähnelt die Mutante *DdMyosin-1E*. Die Affinität des Myosins zu ADP nimmt durch die Mutation leicht ab, die des Akto-Myosin-Komplexes hingegen steigt um den Faktor 5 ($K_{AD} = 10 \mu M$). Dadurch sinkt die thermodynamische Kopplung (K_{AD}/K_D) des Myosins auf 9, es wird zu einem stärker entkoppelten Motor. Darüber hinaus trägt die hohe Affinität von *Myosin-1B-F387Y* zu Aktin in Anwesenheit von ADP ($K_{DA} = 17 nM$) zur Stabilisierung des stark-Aktin-gebundenen Akto-Myosin-ADP-Zustands bei. Neben den veränderten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten hat die Mutation zur Folge, dass die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto-Myosin-1B-F387Y durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert wird. Die apparente Inhibierungskonstante $K_i [Mg^{2+}_{frei}]$ beträgt $190 \mu M$ und liegt dementsprechend im physiologischen Bereich der zellulären Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen (KIM et al., 2007). Da die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation bei $5 mM [Mg^{2+}_{frei}]$ im Vergleich zu *Myosin-1B* Wildtyp jedoch nur um den Faktor 1.5 auf $k_{AD} = 150 s^{-1}$ sinkt, ist

sie nicht wie, im Fall von *DdMyosin-1E*, geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus. *Myosin-1B-Y387F* ist daher auch nicht durch eine hohe *duty ratio* gekennzeichnet.

Wie bereits die Untersuchung von *Myosin-1E-Y388F* lässt auch die kinetische Analyse von *Myosin-1B-F387Y* darauf schließen, dass die Schalter-2 Region wesentlich in die Mg^{2+} -ADP-Dissoziation von Myosinen involviert ist. Ein Tyrosin in Schalter-2 scheint entscheidend für die Mg^{2+} -Sensitivität von Klasse-1 Myosinen zu sein. Darüber hinaus stabilisiert diese Aminosäure durch eine Erhöhung der Affinität von Akto-*Myosin-1B* zu ADP und *Myosin-1B*-ADP zu Aktin den stark-Aktin-gebundenen Zustand des Myosins. Um allerdings die Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Akto-*Myosin-1B* ausreichend zu verlangsamen, sodass sie geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus wird und in einer hohen *duty ratio* resultiert, müssen offensichtlich weitere spezifische Voraussetzungen erfüllt sein. Diese könnten z. B. Schalter-1 der Nukleotidbindungstasche oder Schleife-1 betreffen, die beide die ADP-Dissoziation von Myosinen beeinflussen (SHIMADA et al., 1997; CLARK et al., 2005).

4.1.3 *DdMyosin-2-S456Y* wird durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert

Aufgrund der hohen Konserviertheit des Schalter-2 Elements von Myosinen kann vermutet werden, dass diese Region nicht nur in Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen sondern auch in Myosinen anderer Klassen am Mechanismus der Mg^{2+} -ADP-Dissoziation beteiligt ist. Um weitere Erkenntnisse zur molekularen Grundlage dieses Schritts des ATPase-Zyklus und damit der *duty ratio* von Myosinen zu gewinnen, wurde *DdMyosin-2*, welches sich durch eine niedrige *duty ratio* auszeichnet, als Vertreter einer weiteren Myosinklasse durch den Austausch des nicht-konservierten Serins S456 in Schalter-2 gegen Tyrosin mutiert und die hergestellte Mutante *Myosin-2-S456Y* kinetisch analysiert.

Die Mutation S456Y hat umfangreiche Veränderungen im ATPase-Zyklus von *Myosin-2* zur Folge. Die basale ATPase-Aktivität ($k_{\text{basal}} = 0.39 \text{ s}^{-1}$) sowie die maximale Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität ($k_{\text{cat}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$) von *Myosin-2-S456Y* sind im Vergleich zu *Myosin-2* Wildtyp um den Faktor 3 bzw. 4 erhöht. Eine *Myosin-2* Mutante, in der S456 durch L ersetzt wurde, weist ebenso eine erhöhte basale ATPase-Aktivität auf (MURPHY et al., 2001). Die Autoren führen den Anstieg von k_{basal} auf eine beschleunigte Phosphat-Dissoziation zurück, die aus einem unvollständigen Schließvorgang der Nukleotidbindungstasche durch den größeren Aminosäurerest resultiert. KOPPOLE et al. (2007) ziehen den gleichen Schluss auf Basis struktureller Untersuchungen an *Myosin-2*. Auch die Seitenkette des Tyrosins ist im Vergleich zu Serin größer. Es kann daher angenommen werden, dass das Tyrosin in *Myosin-2-S456Y* ähnliche strukturelle Änderungen in der Nukleotidbindungstasche bewirkt.

Die transientenkinetische Analyse der einzelnen Schritte des ATPase-Zyklus zeigt, dass Akto-*Myosin-2-S456Y* nur langsam mit ATP interagiert. Die ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}) ist um den Faktor 22 erniedrigt, die Geschwindigkeit der Isomerisierung des Komplexes (k_{+2}) sinkt um den Faktor 6. Akto-*Myosin-2-S456Y* ist darüber hinaus aufgrund einer beschleunigten Dissoziation von ADP durch eine 3-fach niedrigere Affinität zu ADP ($K_{\text{AD}} = 556 \mu\text{M}$) im Vergleich zu Akto-*Myosin-2* Wildtyp gekennzeichnet. Dies resultiert in einem Anstieg der thermodynamischen Kopplung ($K_{\text{AD}}/K_{\text{D}}$) von 65 auf 460. Vergleichbar zu *Myosin-1B-F387Y* wird die ADP-Dissoziation aus Akto-*Myosin-2-S456Y*-ADP durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert, die apparente Inhibierungskonstante

$K_i [Mg^{2+}_{\text{frei}}]$ beträgt 530 μM . Aus den kinetischen Parametern kann die *duty ratio* der Mutante zu 0.059 bei 0.2 mM $[Mg^{2+}_{\text{frei}}]$ bzw. 0.063 bei 5 mM $[Mg^{2+}_{\text{frei}}]$ berechnet werden. Im Vergleich zu Myosin-2 Wildtyp (*duty ratio* = 0.011) ist diese um den Faktor 6 erhöht.

Die beschriebenen strukturellen und kinetischen Betrachtungen zeigen, dass auch in Myosin-2 Produkt-Dissoziation, Mg^{2+} -Sensitivität und *duty ratio* durch die Schalter-2 Region beeinflusst werden. Ein Tyrosin in Schalter-2 von Myosin-2 bewirkt die Mg^{2+} -sensitive ADP-Dissoziation des Motors und eine erhöhte *duty ratio*. Die längere Verweildauer des Myosins im stark-Aktin-gebundenen Zustand beruht jedoch auf der verlangsamten Isomerisierung des Akto-Myosin-2-S456Y-ATP-Komplexes und nicht auf einer langsamen geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP. Es lässt sich daher vermuten, dass sich Myosin-2 in der dreidimensionalen Struktur der Nukleotidbindungstasche von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen unterscheidet und die Einführung eines Tyrosins in Schalter-2 nicht in einer zu diesen Motoren vergleichbaren Konformation des Strukturelements und entsprechenden Interaktionen mit benachbarten Regionen resultiert.

4.1.4 Ein Modell von DdMyosin-1E-Y388F beschreibt die strukturelle Grundlage einer hohen *duty ratio* und der Mg^{2+} -Sensitivität von Klasse-1 und Klasse-5 Myosinen

Das in dieser Arbeit mithilfe von Kraftfeldrechnungen erstellte atomare Modell von Myosin-1E-Y388F zeigt strukturelle Änderungen, hervorgerufen durch die Mutation in Schalter-2, die die beobachteten Auswirkungen auf die kinetischen Eigenschaften des Myosins erklären. In Myosin-1E-Y388F ist eine Wasserstoffbrückenbindung, die zwischen Y388 und L183 in Myosin-1E Wildtyp besteht und Schalter-2 mit dem β_7 -Faltblatt der Myosin-Kernstruktur verknüpft (KOLLMAR et al., 2002), nicht ausgebildet. Dies führt zu einer veränderten Konformation von Schalter-2 und in Folge zu der Beeinträchtigung der Koordination von ADP und Mg^{2+} durch die Strukturelemente der Nukleotidbindungstasche.

ROSENFELD et al. (2005) führen den Mechanismus der Mg^{2+} -Regulation auf eine sequentielle Produktabgabe des Myosins zurück. Die Dissoziation des Mg^{2+} -Ions erfolgt vor der ADP-Abgabe, so dass erhöhte Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen nicht nur die Mg^{2+} -Dissoziation sondern auch die Abgabe des Nukleotids verlangsamen. Das Modell von Myosin-1E-Y388F lässt drauf schließen, dass durch die veränderte Schalter-2 Konformation die Affinität des Akto-Myosin-ADP-Komplexes zu Mg^{2+} sowie die Affinität von Akto-Myosin zu ADP herabgesetzt und die Abgabe von Mg^{2+} und ADP beschleunigt werden. Eine hohe Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen in der Umgebung bewirkt keine Stabilisierung des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes und hat daher keinen Einfluss auf die, der Mg^{2+} -Dissoziation folgende, ADP-Abgabe.

Die kinetischen Eigenschaften von Myosin-1B-F387Y und Myosin-5b-Y487F lassen darauf schließen, dass das entworfene Modell auf andere Myosine der Klasse-1 sowie Klasse-5 Myosine anwendbar ist, die ein Tyrosin in Schalter-2 sowie eine hohe Homologie der dreidimensionalen Struktur der Nukleotidbindungstasche zu Myosin-1E aufweisen. Unterstützt wird die Annahme durch die Strukturen von GgMyosin-5a- Mg^{2+} -ADP-BeF_x und GgMyosin-5a-ADP, die den schwach ADP-bindenden Zustand repräsentiert. Diese sind durch eine Wasserstoffbrücke bzw. eine schwache elektrostatische

Wechselwirkung zwischen Tyrosin (Schalter-2) und Leucin (β_7 -Faltblatt der Myosinkernstruktur) gekennzeichnet (COUREUX et al., 2004).

Entsprechend den kinetischen, funktionalen und strukturellen Untersuchungen dieser Arbeit stellen das Tyrosin in Schalter-2, eine Wasserstoffbrückenbindung des Aminosäurerests zu einem Leucin im β_7 -Faltblatt der Myosin-Kernstruktur und die daraus resultierende Konformation der strukturellen Elemente der Nukleotidbindungstasche eine wesentliche molekulare Grundlage der hohen *duty ratio* dieser Myosine und ihrer Regulation durch freie Mg^{2+} -Ionen dar.

4.2 Darstellung und funktionale Charakterisierung eines künstlichen prozessiven Motors

Wichtige Einblicke in den Mechanismus der Prozessivität von Myosinen gelangen durch Studien an dimeren Konstrukten, die neben den Motordomänen und natürlichen Nacken- und *coiled-coil*-Regionen einen C-terminalen Leucin-Zipper enthielten (ROSENFELD und Sweeney, 2004; SWEENEY et al., 2007; YANG et al., 2006). Dieser dient der Unterstützung der natürlichen Dimerisierung und bewirkt, dass die Moleküle auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen in dimerer Form vorliegen. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind jedoch bis heute die minimalen kinetischen, funktionalen und strukturellen Voraussetzungen für prozessive Bewegung von Myosinen nicht bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein künstliches dimeres Myosin in einem Struktur-basierten *Protein Engineering*-Ansatz entworfen und in *D. discoideum* produziert, das nur die Motordomäne von *DdMyosin-5b*, für das auf Basis kinetischer und funktionaler Studien prozessives Verhalten postuliert wird (TAFT et al., 2008), als Bestandteil einer Myosin-Polypeptidkette enthält. Die nativen Nackendomänen wurden durch künstliche Hebelarme ersetzt, die Dimerbildung sollte ausschließlich durch einen Leucin-Zipper gewährleistet werden. Mithilfe funktionaler Studien an diesem künstlichen dimeren Motor Myosin-5b-2R-LZ-EYFP sollte untersucht werden, ob die Motordomäne allein die Fähigkeit von Myosinen zu prozessivem Verhalten determiniert.

Der artifizielle Motor Myosin-5b-2R-LZ-EYFP wurde mittels TIRF-Fluoreszenzmikroskopie auf Einzelmolekülebene charakterisiert. Bei einer Konzentration von 0.5 nM, wie sie für diese Messungen erforderlich ist, liegen nur wenige Prozent der Moleküle in dimerer Form vor, wie in einem Bleich-Experiment festgestellt wurde. Dies lässt auf eine begrenzte Stabilität des künstlichen Dimers schließen. Unter dem TIRF-Mikroskop konnte jedoch bei Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen > 10 mM eine prozessive Fortbewegung dieser dimeren Motoren mit einer mittleren Geschwindigkeit von 244 nm/s und einer mittlere Laufweite von ~ 700 nm beobachtet werden. Experimente zur Verweildauer (*dwelt time*) des fluoreszenzmarkierten Cy3-EDA-ATP (OIWA et al., 2000) zeigen die Regulation der Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Akto-Myosin-5b-2R-LZ-EYFP durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen. Das künstliche Myosin bestätigt daher den von TAFT et al. (2008) postulierten Mechanismus zur Regulation der Prozessivität von *DdMyosin-5b*. Hohe Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen verlangsamen die ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP, erhöhen die *duty ratio* des Myosins und ermöglichen so prozessive Bewegung. In Experimenten mit einer optischen Falle, durchgeführt von Dr. Walter Steffen (Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover) wurde die Schrittweite von Myosin-5b-2R-LZ-EYFP zu ~ 7 nm ermittelt. Dies

entspricht der Schrittweite einer Myosin-2 Motordomäne mit dem künstlichen Hebelarm „2R“ und bestätigt das proportionale Verhältnis von Schrittweite und Hebelarmlänge (RUFF et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen künstlichen funktionalen prozessiven Motor *in silico* zu entwerfen und unter Verwendung von *Protein Engineering*-Methoden darzustellen. Strukturelle Analysen und Kraftfeldrechnungen ermöglichten das gezielte Modifizieren und Zusammensetzen der verwendeten Strukturelemente und so die Gewährleistung einer zumindest teilweisen Dimerisierung des Moleküls ohne natürliche *coiled-coil*-Region und der, für prozessive Bewegung notwendigen, Flexibilität der Übergänge zwischen Motordomänen, Hebelarmen und Leucin-Zipper. Mithilfe der Untersuchung des künstlichen Dimers Myosin-5b-2R-LZ-EYFP auf Einzelmolekülebene konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zum prozessivem Verhalten eines Myosins allein durch die spezifischen kinetischen Eigenschaften der Myosinmotordomäne generiert wird. Dazu zählen in erster Linie eine langsame geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziation sowie eine hohe Affinität des Myosin-ADP-Komplexes zu Aktin. Die leichten Ketten der nativen Nackendomäne sind nicht notwendig für die prozessive Bewegung. Intramolekulare Spannung, die den chemomechanischen Zyklus der beiden Köpfe in prozessiven Klasse-5 Myosinen koordiniert (ROSENFELD et al., 2004; VEIGEL et al., 2005), wird auch in Myosin-5b-2R-LZ-EYFP erzeugt und durch die künstlichen Hebelarme vermittelt. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass freie Mg^{2+} -Ionen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Regulation prozessiver Eigenschaften von Klasse-5 Myosinen spielen.

4.3 Kinetische Analyse eines Klasse-11 Myosins aus *Nicotiana tobacum*

Für die intrazelluläre Verteilung von Vesikeln und Molekülen spielt die zytoplasmatische Strömung in pflanzlichen Zellen eine entscheidende Rolle. Die Kraft, die diesen Prozess antreibt, wird von Myosinen der Klasse-11 erzeugt, welche Organellen entlang von Aktinfilamenten transportieren (YOKOTA et al., 1995; WANG und Pesacrete, 2004). Dies resultiert in der Strömung des hochviskosen Zytoplasmas, welche Geschwindigkeiten bis zu 100 $\mu\text{m/s}$ erreichen kann und damit die schnellste für Motorproteine bekannte Bewegung darstellt (SHIMMEN und Yokota et al., 1994). Nur drei Klasse-11 Myosine aus den Organismen *Chara corallina*, *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tobacum* konnten bis heute aufgereinigt und näher untersucht werden (z. B. HIGASHI-FUJIME et al., 1995; TOMINAGA et al., 2003; HACHIKUBO et al., 2007). Dies ist auf proteolytischen Abbau während des Aufreinigungsprozesses und die hohe Instabilität der isolierten Proteine zurückzuführen. Es gibt daher bis heute nur wenige Erkenntnisse zu den kinetischen und funktionalen Eigenschaften dieser Motoren. Wie auch die phylogenetisch eng verwandte, tierische Klasse-5 scheint Klasse-11 eine heterogene Zusammensetzung aus prozessiven und nicht prozessiven Myosinen aufzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Eigenschaften eines prozessiven Klasse-11 Myosins aus *N. tobacum* (*NtMyosin-11*) analysiert, welches sich mit einer Geschwindigkeit von 7 $\mu\text{m/s}$ mehr als 10mal schneller als andere prozessive Myosine fortbewegt (TOMINAGA et al., 2003). Die Untersuchung sollte dazu beitragen die molekularen Mechanismen aufzuklären, welche prozessives Verhalten von Klasse-11 Myosinen determinieren und diese Motoren zu der schnellen Bewegung befähigen. Das für die Charakterisierung verwendete Konstrukt *NtMyosin-11-2R* setzt sich aus der Motordomäne von *NtMyosin-11* sowie dem künstlichen Hebelarm „2R“ zusammen und wurde in *D. discoideum* exprimiert.

4.3.1 ATP und Trehalose erhöhen die Stabilität von isoliertem *NtMyosin-11-2R*

Durch Optimierung des, von MANSTEIN und Hunt (1995) entwickelten, Verfahrens zur Aufreinigung rekombinanter Myosinkonstrukte aus *D. discoideum* gelang eine teilweise Stabilisierung und Bewahrung der Motoraktivität des isolierten Proteins *NtMyosin-11-2R*. Wesentlich ist dabei die Zugabe von ATP. Das Nukleotid wird von *NtMyosin-11-2R* zu ADP umgesetzt und bleibt als solches an Myosin gebunden. Der stabilisierende Effekt der ADP-Komplexbildung ist auch für weitere pflanzliche Myosine in der Literatur beschrieben (HACHIKUBO et al., 2007; KASHIYAMA et al., 2001). Auf Basis von Berechnungen zur Moleküldynamik, die eine hohe Flexibilität der Elemente P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 der Nukleotidbindungstasche von Myosinen im nukleotidungebundenen Zustand zeigen (KOPPOLE et al., 2006), kann vermutet werden, dass diese Regionen in Klasse-11 Myosinen mit längerer Abwesenheit von Nukleotid Konformationen einnehmen, die eine erneute Bindung von ATP erschweren und schließlich unmöglich machen. Diese Annahme wird durch den experimentellen Befund einer weiteren Stabilisierung des Myosins durch Zugabe von Trehalose gestützt, welche die Viskosität der Proteinlösung erhöht.

4.3.2 Die hohen Reaktionsgeschwindigkeiten von *NtMyosin-11-2R* ermöglichen die schnelle prozessive Bewegung des Klasse-11 Myosins

Mithilfe der transientenkinetischen Analyse von *NtMyosin-11-2R* konnten verschiedene Parameter identifiziert werden, die die stark-Aktin-bindenden Akto-Myosin-Zustände des ATPase-Zyklus stabilisieren und damit als Anpassung an prozessives Verhalten interpretiert werden können. Einzelne Reaktionsschritte der ATP-Umsetzung dieses Myosins weisen bei Raumtemperatur so hohe Geschwindigkeiten auf, dass sie nicht mit dem *stopped-flow*-Spektrophotometer beobachtbar sind. Um diese dennoch kinetisch charakterisieren zu können, wurde in solchen Fällen die Umgebungstemperatur gesenkt und so die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt. Im Folgenden werden die entscheidenden kinetischen Parameter des ATPase-Zyklus von *NtMyosin-11-2R* beschrieben und mit den Eigenschaften des, von ITO et al. (2007) auf Basis kinetischer Messungen als nicht-prozessiven Motor beschriebenen, Klasse-11 Myosins aus *C. corallina* (*CcMyosin-11*) sowie prozessiver Myosine der Klassen 5, 6 und 7 verglichen.

NtMyosin-11-2R weist mit $K_1k_{+2} = 0.78 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine 6-fach kleinere apparente ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung als *CcMyosin-11* auf. k_{+2} , die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung von Akto-*NtMyosin-11-2R*-ATP vom stark- in den schwach-Aktin-bindenden Zustand beträgt bei 5 °C 260 s^{-1} . Unter der Annahme einer zu *C. corallina* Myosin-11 und Myosin-2 aus Kaninchen vergleichbaren Aktivierungsenergie dieser Konformationsänderung von $E_A \sim 54 \text{ kJ/mol}$ kann k_{+2} bei 20 °C gemäß der Temperaturabhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeiten nach Arrhenius zu $\sim 1100 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden (MILLAR und Geeves, 1983). *NtMyosin-11-2R* zeigt damit Ähnlichkeit zu anderen prozessiven Myosinen wie *GgMyosin-5a* ($K_1k_{+2} = 0.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{+2} = 870 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{cat}} = 15 \text{ s}^{-1}$; DE LA CRUZ et al., 1999). Im Fall von *NtMyosin-11-2R* ist k_{+2} im Verhältnis zur maximalen Aktin-aktivierten ATP-Umsatzgeschwindigkeit ($k_{\text{cat}} = 201 \text{ s}^{-1}$) jedoch deutlich langsamer und trägt so maßgeblich zur Verlängerung des Aktin-gebundenen Zustands bei. Darüber hinaus ist, im Gegensatz zu den meisten anderen Myosinen, die Isomerisierung des Akto-*NtMyosin-11-2R*-ATP-Komplexes mit

$k_{-2} = 1.17 \text{ s}^{-1}$ als Geschwindigkeit der Rückreaktion zu einem gewissen Anteil reversibel (BAGSHAW und Trentham, 1973; ZENG et al., 2004).

Die schnelle ATP-Hydrolyse prozessiver Myosine ermöglicht eine rasche Bindung des Myosin-ADP- P_i -Komplexes an Aktin und verkürzt so die Dauer des Aktin-ungebundenen Zustands. Mit einer Hydrolysegeschwindigkeit ($k_{+3} + k_{-3}$) von weit über 1000 s^{-1} verläuft dieser Schritt für *NtMyosin-11-2R* noch deutlich schneller als für andere prozessive Myosine wie *MmMyosin-5* ($(k_{+3} + k_{-3}) = 200 \text{ s}^{-1}$; TRYBUS et al., 1999) oder *GgMyosin-5a* ($(k_{+3} + k_{-3}) = 750 \text{ s}^{-1}$).

Ein weitere kinetische Eigenschaft prozessiver Motoren stellt das hohe Verhältnis von ADP-Bindungs- zu ATP-Bindungsgeschwindigkeit (k_{+AD}/K_1k_{+2}) in Anwesenheit von Aktin dar. Es dient dazu, den stark Aktin-gebundenen Akto-Myosin-ADP-Komplex in Anwesenheit von zellulären Konzentrationen an ADP und ATP zu stabilisieren. Im Vergleich zu *CcMyosin-11* ($k_{+AD}/K_1k_{+2} = 2.5$) bzw. prozessiven Myosinen wie *DmMyosin-7b* ($k_{+AD}/K_1k_{+2} = 32$; YANG et al., 2005) oder *SsMyosin-6* ($k_{+AD}/K_1k_{+2} = 30$; DE LA CRUZ et al., 1999) ist dieses Verhältnis mit $k_{+AD}/K_1k_{+2} = 800$ für *NtMyosin-11-2R* deutlich höher.

Schließlich weisen auch die zum ersten Mal für ein Klasse-11 Myosin ermittelten Aktin-Bindungseigenschaften von *NtMyosin-11-2R* auf die hohe Stabilität der stark-Aktin-bindenden Zustände des Motors hin. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Akto-*NtMyosin-11-2R* beträgt $K_A = 260 \text{ pM}$. Sie liegt damit im subnanomolaren Bereich und ist im Vergleich zu anderen prozessiven Myosinen wie *GgMyosin-5a* ($K_A = 3.3 \text{ nM}$; HANNEMANN et al., 2005) oder *DmMyosin-7b* ($K_A = 35 \text{ nM}$) deutlich kleiner. Auch in Anwesenheit von ADP ist die Affinität von *NtMyosin-11-2R* zu Aktin ($K_{DA} = 4.9 \text{ nM}$) höher (*GgMyosin-5a* $K_{DA} = 44 \text{ nM}$, *DmMyosin-7b* $K_{DA} = 34 \text{ nM}$).

Als entscheidendes Kriterium für Prozessivität von Myosinen wird in der Literatur eine *duty ratio* größer 0.5 genannt (DE LA CRUZ et al., 1999). Für *NtMyosin-11-2R* ergibt sich aus den ermittelten kinetischen Parametern k_{AD} , k_{+2} und k_{cat} eine *duty ratio* von 0.23 ± 0.14 . Da diese Parameter aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeiten bzw. der geringen Konzentration an aktivem Protein nicht experimentell bestimmt sondern nur berechnet werden konnten, weisen sie hohe Fehler auf, welche in der großen Spanne der kalkulierten *duty ratio* von $\pm 60 \%$ resultieren. Auch unter Berücksichtigung dieses Fehlers liegt die *duty ratio* von *NtMyosin-11-2R* jedoch unter 0.5 und lässt damit nicht auf das prozessive Verhalten dieses Myosins schließen. Der niedrige Wert der *duty ratio* ist auf die sehr hohen Geschwindigkeiten der Isomerisierung des Akto-*NtMyosin-11-2R*-ATP-Komplexes ($k_{+2} \sim 1100 \text{ s}^{-1}$) sowie der ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-ADP ($k_{AD} \sim 4700 \text{ s}^{-1}$) zurückzuführen. In dieser Hinsicht ähnelt *NtMyosin-11-2R* *CcMyosin-11*, für das k_{+2} zu $\sim 2600 \text{ s}^{-1}$, k_{AD} zu $\sim 2800 \text{ s}^{-1}$ und eine *duty ratio* von 0.3 bestimmt wurden (ITO et al., 2007). In beiden Untersuchungen wurde die hohe Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation ermittelt, indem k_{AD} bei verschiedenen niedrigen Temperaturen gemessen und die erhaltenen Werte extrapoliert wurden. Dabei wurde auf Basis von vergleichbaren Messungen an Herzmuskelmyosin aus Ratte und Kaninchen (SIEMANKOWSKY et al., 1985) vorausgesetzt, dass die Aktivierungsenergie (E_A) und der Frequenzfaktor (A), welche gemäß Arrhenius die Temperaturabhängigkeit kinetischer Reaktionen determinieren, konstant sind. ITO et al. (2007) bestimmen auf die selbe Weise k_{+2} für *CcMyosin-11*, da bei Messungen der Temperaturabhängigkeit dieses Reaktionsschritts an Skelettmuskelmyosin-2 aus Kaninchen ebenso keine Änderung von E_A und A beobachtet wurde (MILLAR und Geeves, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde k_{+2} von *NtMyosin-11-2R* daher unter Annahme einer konstanten Aktivierungsenergie und

eines konstanten Frequenzfaktors berechnet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich E_A und A dieser beiden Reaktionsschritte im Fall von *NtMyosin-11-2R* bzw. *CcMyosin-11* bei einer über den Messtemperaturen liegenden Temperatur z. B. aufgrund einer Konformationsänderung im Molekül ändern. Ein Absinken von E_A und/oder A hätte eine Erniedrigung von k_{AD} bzw. k_{+2} und im Weiteren eine Erhöhung der *duty ratio* zur Folge und könnte so das prozessive Verhalten von *NtMyosin-11* erklären. Unter den beschriebenen Umständen könnte auch *CcMyosin-11* einen prozessiven Motor darstellen. Die vorliegende Arbeit zeigt damit, dass die heute verfügbaren Methoden zur kinetischen Charakterisierung enzymatischer Reaktionen aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeiten der ATP-Umsetzung von Klasse-11 Myosinen nur bedingt geeignet sind, um den ATPase-Zyklus dieser Motoren zu analysieren.

Auf Basis der ermittelten kinetischen Parameter von *NtMyosin-11-2R* kann allerdings auch ein Modell beschrieben werden, welches die schnelle prozessive Bewegung von *NtMyosin-11* trotz einer niedrigen Verweildauer in stark-Aktin-gebundenen Zuständen erklären kann. Entscheidend hierfür ist die hohe maximale Aktin-aktivierte ATPase-Umsatzgeschwindigkeit des Myosins. Sie beträgt $k_{cat} = 201 \text{ s}^{-1}$ und resultiert in einer sehr kurzen Dauer eines ATPase-Zyklus (t_z), welche sich gemäß

$$t_z = \frac{1}{k_{cat}}$$

t_z : ATPase-Zyklusdauer; k_{cat} : maximale Aktin-aktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit

zu $t_z = 5 \text{ ms}$ berechnen lässt. Im Vergleich dazu weisen schnelle prozessive Myosine anderer Klassen wie *GgMyosin-5a* ($t_z = 67 \text{ ms}$; DE LA CRUZ et al., 1999), *SsMyosin-6* ($t_z = 120 \text{ ms}$; DE LA CRUZ et al., 2001) oder *DmMyosin-7b* ($t_z = 119 \text{ ms}$; YANG et al., 2005) eine mehr als 13mal längere ATPase-Zyklusdauer auf. Gemäß der *duty ratio* von 0.23 verbringt *NtMyosin-11* etwa 1.25 ms in stark-Aktin-gebundenen Zuständen. Die oben beschriebenen kinetischen Parameter des Motors weisen auf eine besonders hohe Stabilität des Akto-Myosin-Komplexes in Ab- und Anwesenheit von ADP sowie die langsame Interaktion von Akto-Myosin mit ATP hin. Darüber hinaus trägt die schnelle ATP-Hydrolyse zu einer Verkürzung der Zeitdauer bei, während der der Motor nicht an Aktin gebunden ist. Die dimere Struktur des Moleküls senkt schließlich die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül im Aktin-ungebundenen Zustand vorliegt. Im Fall der gleichzeitigen Ablösung beider Myosinköpfe führt die zytoplasmatische Strömung vermutlich zu einer Diffusion des Motors entlang des Aktinfilaments in die Richtung der Myosinbewegung. Weniger als 3.75 ms benötigt *NtMyosin-11*, um erneut die Konformation eines Zustands einzunehmen, der die Bindung an Aktin ermöglicht. Unter der Annahme eines zu *GgMyosin-5a* vergleichbaren Diffusionskoeffizienten von $D = 0.26 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (ALI et al., 2007) und einer um den Faktor 1.2 höheren Viskosität des Zytoplasmas im Vergleich zu Wasser (YAMAMOTO et al., 2006) diffundiert *NtMyosin-11* in dieser Zeit entsprechend dem mittleren Verschiebungsquadrat \bar{x}^2 für eindimensionale Bewegung

$$\bar{x}^2 = \frac{2 \cdot D \cdot t}{1.2}$$

\bar{x}^2 : mittleres Verschiebungsquadrat; D : Diffusionskoeffizient; t : Zeit

weniger als 39 nm. Diese maximale Strecke entspricht in etwa der Schrittweite des Myosins von 35 nm (TOMINAGA et al., 2003) bzw. dem Abstand zweier Aktinbindungsstellen. Aufgrund der schnellen ATP-Umsetzung kann der Motor somit nahezu unmittelbar an der gleichen oder der darauffolgenden Bindungsstelle des Aktinfilaments assoziieren und sich so prozessiv fortbewegen. Das dargestellte Modell beschreibt damit einen neuen prozessiven Bewegungsmechanismus von Myosinen, der nicht auf einer langsamen geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Dissoziation des Akto-Myosin-ADP-Komplexes und einer hohen *duty ratio* beruht. Die Weiterentwicklung der Techniken zur Beobachtung schneller chemischer Reaktionen wird in der Zukunft die Bestimmung der tatsächlichen Geschwindigkeiten der schnellen Reaktionsschritte des ATPase-Zyklus von Klasse-11 Myosinen ermöglichen und so zeigen, ob dieses Modell das Bewegungsverhalten von Klasse-11 Myosinen erklärt.

KAPITEL V

LITERATURVERZEICHNIS

- ALI, M.Y., Krementsova, E.B., Kennedy, G.G., Mahaffy, R., Pollard, T.D., Trybus, K.M. und Warshaw, D.M. (2007) Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 4332-4336
- ANSON, M., Geeves, M.A., Kurzawa, S.E. und Manstein, D.J. (1996) Myosin motors with artificial lever arms. *EMBO J*, **15**, 6069-6074
- AWATA, J.Y., Kashiya, T., Ito, K. und Yamamoto K. (2003) Some motile properties of fast characean myosin. *J Mol Biol*, **326**, 659-63
- BAGSHAW, C.R. und Trentham, D.R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J*, **141**, 331-349
- BAGSHAW, C.R. und Trentham, D.R. (1973) The reversibility of adenosine triphosphate cleavage by myosin. *Biochem J*, **133**, 323-328
- BÄHLER, M. (2000) Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 52-59
- BATRA, R. und Manstein, D.J. (1999) Functional characterisation of *Dictyostelium* myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine. *Biol Chem*, **380**, 1017-1023
- BAUER, C.B., Kuhlman, P.A., Bagshaw, C.R. und Rayment, I. (1997) X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg.2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl) nucleotides bound to the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *J Mol Biol*, **274**, 394-407
- BEMENT, W.M. und Mooseker, M.S. (1995) TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton*, **31**, 87-92
- BERG, J.S., Powell, B.C. und Cheney, R.E. (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, **12**, 780-794
- BETAPUDI, V., Licate, L.S. und Egelhoff, T.T. (2006) Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res*, **66**, 4725-4733
- BOEDA, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., Houdusse, A., Legrain, P., Wolfrum, U., Richardson, G. und Petit, C. (2002) Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three *Usher I* gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J*, **21**, 6689-6699
- BONNE, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B. und Schwartz, K. (1998) *Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects*. *Circ Res*, **83**, 580-593

- BOSGRAAF, L. und van Haastert, P.J. (2006) The regulation of myosin II in *Dictyostelium*. *Eur J Cell Biol*, **85**, 969-979
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254
- CHANCE, B., Eisenhardt, R. M., Gibson, Q. H., Lonberg-Holm, K. K. (1964). Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry. New York: *Academic Press*. p 89-102
- CLARK, R., Ansari, M.A., Dash, S., Geeves, M.A. und Coluccio, L.M. (2005) Loop 1 of transducer region in mammalian class I myosin, Myo1b, modulates actin affinity, ATPase activity, and nucleotide access. *J Biol Chem*, **280**, 30935-30942
- CONIBEAR, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovacs, M. und Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol*, **10**, 831-835
- COPE, M.J., Whisstock, J., Rayment, I. und Kendrick-Jones, J. (1996) Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure*, **4**, 969-987
- COUREUX, P.D., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J*, **23**, 4527-4537
- COUREUX, P.D., Wells, A.L., Ménétrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature*, **425**, 419-423
- CREMO, C.R. und Geeves, M.A. (1998) Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochemistry*, **37**, 1969-1978
- CRIDDLE, A.H., Geeves, M.A. und Jeffries, T. (1985) The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin. *Biochem J*, **232**, 343-349
- DE LA CRUZ, E.M., Ostap, E.M. und Sweeney, H.L. (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem*, **276**, 32373-32381
- DE LA CRUZ, E.M., Wells, A.L., Rosenfeld, S.S., Ostap, E.M. und Sweeney, H.L. (1999) The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13726-13731
- DOMINGUEZ, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M. und Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*, **94**, 559-571
- DÜRRWANG, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Kull, F.J., Tsiavaliaris, G., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (2006) *Dictyostelium* myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci*, **119**, 550-558
- FALK, D.L., Wessels, D., Jenkins, L., Pham, T., Kuhl, S., Titus, M.A. und Soll, D.R. (2003) Shared, unique and redundant functions of three members of the class I myosins (MyoA, MyoB and MyoF) in motility and chemotaxis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, **116**, 3985-3999
- FARRUGGIA, G., Iotti, S., Prodi, L., Montalti, M., Zaccheroni, N., Savage, P.B., Trapani, V., Sale, P. und Wolf, F.I. (2006) 8-hydroxyquinoline derivatives as fluorescent sensors for magnesium in living cells. *J Am Chem Soc*, **128**, 344-350
- FERSHT A. (1985) Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and Company, New York
- FIRTEL, R.A. (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Dev*, **9**, 1427-1444

- FISCHER, S., Windshugel, B., Horak, D., Holmes, K.C. und Smith, J.C. (2005) Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6873-6878
- FISHER, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M. und Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry*, **34**, 8960-8972
- FOTH, B. J., Goedecke, M. C., Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 3681-3686
- FUJITA-BECKER, S., Durrwang, U., Erent, M., Clark, R.J., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (2005) Changes in Mg²⁺ ion concentration and heavy chain phosphorylation regulate the motor activity of a class I myosin. *J Biol Chem*, **280**, 6064-6071
- FUKUI, Y. und Inoue, S. (1997) Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton*, **36**, 339-354
- FURCH, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M.A., Holmes, K.C. und Manstein, D.J. (1999) Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of *Dictyostelium myosin*. *J Mol Biol*, **290**, 797-809
- FURCH, M., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry*, **37**, 6317-26
- GARMAN, E. und Schneider, T.R. (1997). Macromolecular cryocrystallography. *J Appl Cryst*, **30**, 211-237
- GEEVES, M.A., Fedorov, R. und Manstein, D.J. (2005) Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1462-1477
- GEEVES, M.A., Perreault-Micale, C. und Coluccio, L.M. (2000) Kinetic analyses of a truncated mammalian myosin I suggest a novel isomerization event preceding nucleotide binding. *J Biol Chem*, **275**, 21624-21630
- GEEVES, M.A. und Holmes, K.C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem*, **68**, 687-728
- GEEVES, M.A., und Conibear, P.B. (1995) The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys J*, **68**, 194S-201S
- GEEVES, M.A., Goody, R.S., und Gutfreund, H. (1984) Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil*, **5**, 351-361
- GERISCH, G. und Wick, U. (1975) Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from *Dictyostelium* cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **65**, 364-370
- GOODY, R.S. (2003) The missing link in the muscle cross-bridge cycle. *Nat Struct Biol*, **10**, 773-775
- GRÄF, R., Daunderer, C. und Schulz, I. (2004) Molecular and functional analysis of the *Dictyostelium* centrosome. *Int Rev Cytol*, **241**, 155-202
- GRIGORENKO, B.L., Rogov, A.V., Topol, I.A., Burt, S.K., Martinez, H.M. und Nemukhin, A.V. (2007) Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7057-7061
- GULICK, A.M., Bauer, C.B., Thoden, J.B. und Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry*, **36**, 11619-11628

- HACHIKUBO, Y., Ito, K., Schiefelbein, J., Manstein, D.J. und Yamamoto, K. (2007) Enzymatic activity and motility of recombinant *Arabidopsis* myosin XI, MYA1. *Plant Cell Physiol*, **48**, 886-891
- HAMMER, J.A., 3rd und Jung, G. (1996) The sequence of the *Dictyostelium* myo J heavy chain gene predicts a novel, dimeric, unconventional myosin with a heavy chain molecular mass of 258 kDa. *J Biol Chem*, **271**, 7120-7127
- HANNEMANN, D.E., Cao, W., Olivares, A.O., Robblee, J.P. und De La Cruz, E.M. (2005) Magnesium, ADP, and actin binding linkage of myosin V: evidence for multiple myosin V-ADP and actomyosin V-ADP states. *Biochemistry*, **44**, 8826-8840
- HENN, A. und De La Cruz, E.M. (2005) Vertebrate myosin VIIb is a high duty ratio motor adapted for generating and maintaining tension. *J Biol Chem*, **280**, 39665-39676
- HIGASHI-FUJIME, S. (2003) The fastest myosin from green algae *Chara corallina*: Its sliding mechanism. *Recent Res Devel Biophys Biochem*, **3**, 801-814
- HIGASHI-FUJIME, S., Ishikawa, R., Iwasawa, H., Kagami, O., Kurimoto, E., Kohama, K. und Hozumi, T. (1995) The fastest actin-based motor protein from the green algae, *Chara*, and its distinct mode of interaction with actin. *FEBS Lett*, **375**, 151-154.
- HIGASHI-FUJIME, S. (1980) Active movement *in vitro* of bundles of microfilaments isolated from *Nitella* cell. *J Cell Biol*, **87**, 569-578
- HIMMEL, D.M., Gourinath, S., Reshetnikova, L., Shen, Y., Szent-Gyorgyi, A.G. und Cohen, C. (2002) Crystallographic findings on the internally uncoupled and near-rigor states of myosin: further insights into the mechanics of the motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12645-12650
- HOLMES, K.C., Schroder, R.R., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1819-1828
- HOLMES, K.C. und Schröder, R.R. (2003) Switch 1 opens on strong binding to actin. Molecular and cellular aspects of muscle contraction. *Adv Exp Med Biol*, **538**, 159-166; discussion 166-157
- HOLMES, K.C. (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol*, **7**, R112-118
- HOUDUSSE, A. und Cohen, C. (1996) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure*, **4**, 21-32
- ITO, K., Ikebe, M., Kashiya, T., Mogami, T., Kon, T. und Yamamoto, K. (2007) Kinetic mechanism of the fastest motor protein, *Chara* myosin. *J Biol Chem*, **282**, 19534-19545
- ITO, K., Kashiya, T., Shimada, K., Yamaguchi, A., Awata, J., Hachikubo, Y., Manstein, D.J. und Yamamoto, K. (2003) Recombinant motor domain constructs of *Chara corallina* myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 958-964
- JONTES, J.D., Milligan, R.A., Pollard, T.D. und Ostap, E.M. (1997) Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14332-14337
- JUNG, G., Remmert, K., Wu, X., Volosky, J.M. und Hammer, J.A., 3rd. (2001) The *Dictyostelium* CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol*, **153**, 1479-1497
- JUNG, G., Wu, X. und Hammer, J.A., 3rd. (1996) *Dictyostelium* mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J Cell Biol*, **133**, 305-323

- KAMITSUBO E. (1966) Motile protoplasmic fibrils in cells of *characeae* II. Linear fibrillar structure and its bearing on protoplasmic streaming. *Proc Japn Acad*, **42**, 640-643
- KASHIYAMA, T., Ito, K. und Yamamoto, K. (2001) Functional expression of a chimeric myosin-containing motor domain of *Chara* myosin and neck and tail domains of *Dictyostelium* myosin II. *J Mol Biol*, **311**, 461-466
- KESSIN, R.H. (2001) *Dictyostelium*. Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. *Cambridge University Press*
- KIM, H.M., Yang, P.R., Seo, M.S., Yi, J.S., Hong, J.H., Jeon, S.J., Ko, Y.G., Lee, K.J. und Cho, B.R. (2007) Magnesium ion selective two-photon fluorescent probe based on a benzo[h]chromene derivative for *in vivo* imaging. *J Org Chem*, **72**, 2088-2096
- KINTSES, B., Gyimesi, M., Pearson, D.S., Geeves, M.A., Zeng, W., Bagshaw, C.R. und Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. *EMBO J*, **26**, 265-274
- KLICHE, W., Fujita-Becker, S., Kollmar, M., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2001) Structure of a genetically engineered molecular motor. *EMBO J*, **20**, 40-46
- KNECHT, D.A. und Loomis, W.F. (1987) Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, **236**, 1081-1086
- KNETSCH, M.L., Tsiavaliaris, G., Zimmermann, S., Ruhl, U. und Manstein, D.J. (2002) Expression vectors for studying cytoskeletal proteins in *Dictyostelium discoideum*. *J Muscle Res Cell Motil*, **23**, 605-611
- KOLLMAR, M. (2006) Thirteen is enough: the myosins of *Dictyostelium discoideum* and their light chains. *BMC Genomics*, **7**, 183
- KOLLMAR, M., Durrwang, U., Kliche, W., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J*, **21**, 2517-2525
- KOMABA, S., Inoue, A., Maruta, S., Hosoya, H. und Ikebe, M. (2003) Determination of human myosin III as a motor protein having a protein kinase activity. *J Biol Chem*, **278**, 21352-21360
- KOPPOLE, S., Smith, J.C. und Fischer, S. (2007) The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor. *Structure*, **15**, 825-837
- KOPPOLE, S., Smith, J.C. und Fischer, S. (2006) Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke. *J Mol Biol*, **361**, 604-616
- KOUYAMA, T. und Mihashi, K. (1996). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-38
- KOZIELSKI, F., Sack, S., Marx, A., Thormählen, M., Schönbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E.M. und Mandelkow, E. (1997) The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, **91**, 985-994
- KRENDEL, M. und Mooseker, M.S. (2005) Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 239-251
- KÜHNE W. (1864) Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- KULL, F.J. und Endow, S.A. (2002) Kinesin: switch I & II and the motor mechanism. *J Cell Sci*, **115**, 15-23

- KULL, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fletterick, R.J. und Vale, R.D. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, **380**, 550-555
- KURZAWA, S.E., Manstein, D.J. und Geeves, M.A. (1997) *Dictyostelium discoideum* myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry*, **36**, 317-323
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- LEBOWITZ, J. L. S. und Schuck, P. (2002) Modern analytic ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci*, **11**, 2067-2079
- LECHLER, T., Shevchenko, A. und Li, R. (2000) Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization. *J Cell Biol*, **148**, 363-373
- LEE, W.L., Bezanilla, M. und Pollard, T.D. (2000) Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol*, **151**, 789-800
- LEHRER, S.S. und Kerwar, G. (1972) Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry*, **11**, 1211-1217
- LI, J.F. und Nebenführ, A. (2008) The tail that wags the dog: the globular tail domain defines the function of myosin V/XI. *Traffic*, **9**, 290-298
- LOOMIS, W. (1975) *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. *Academic Press, NY*
- LOOMIS, W.F., Jr. (1971) Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues. *Exp Cell Res*, **64**, 484-486
- MADIGAN, M., Martinko, J.M. und Parker, J. (2001) Brock-Mikrobiologie. *Spektrum, Akademischer Verlag*
- MALNASI-CSIZMADIA, A., Pearson, D.S., Kovacs, M., Woolley, R.J., Geeves, M.A. und Bagshaw, C.R. (2001) Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a *Dictyostelium* myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry*, **40**, 12727-12737
- MALNASI-CSIZMADIA, A., Woolley, R.J. und Bagshaw, C.R. (2000) Resolution of conformational states of *Dictyostelium* myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry*, **39**, 16135-16146
- MANSTEIN, D.J. und Hunt, D.M. (1995) Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil*, **16**, 325-332
- MANSTEIN, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P. und Hunt, D.M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, **162**, 129-134
- MANSTEIN, D.J., Ruppel, K.M. und Spudich, J.A. (1989a) Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, **246**, 656-658
- MANSTEIN, D.J., Titus, M.A., De Lozanne, A. und Spudich, J.A. (1989b) Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J*, **8**, 923-932
- MEHTA, A.D., Rock, R.S., Rief, M., Spudich, J.A., Mooseker, M.S. und Cheney, R.E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, **400**, 590-593
- MÉNÉTREY, J., Llinas, P., Cicolari, J., Squires, G., Liu, X., Li, A., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2008) The *post-rigor* structure of myosin VI and implications for the recovery stroke. *EMBO J*, **27**, 244-252

- MÉNÉTREY, J., Llinas, P., Mukherjea, M., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2007) The structural basis for the large powerstroke of myosin VI. *Cell*, **131**, 300-308
- MÉNÉTREY, J., Bahloul, A., Wells, A.L., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2005) The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature*, **435**, 779-785
- MERMALL, V., Post, P.L. und Mooseker, M.S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, **279**, 527-533
- MICHAELIS, L. und Menten, M.L. (1913) *Biochem. Z*, **49**, 333-369
- MILLAR, N.C. und Geeves, M.A. (1983) The limiting rate of the ATP-mediated dissociation of actin from rabbit skeletal muscle myosin subfragment 1. *FEBS Lett*, **160**, 141-148.
- MURPHY, C.T., Rock, R.S. und Spudich, J.A. (2001) A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size. *Nat Cell Biol*, **3**, 311-315
- NAGAI, R. und Rebhun, L. (1966) Cytoplasmic microfilaments in streaming *Nitella* cells. *J Ultrastruct Res*, **14**, 571-589
- NOVAK, K.D. und Titus, M.A. (1998) The myosin I SH3 domain and TEDS rule phosphorylation site are required for *in vivo* function. *Mol Biol Cell*, **9**, 75-88
- NOVAK, K.D., Peterson, M.D., Reedy, M.C. und Titus, M.A. (1995) *Dictyostelium* myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J Cell Biol*, **131**, 1205-1221
- NYITRAI, M. und Geeves, M.A. (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1867-1877
- ODRONITZ, F. und Kollmar, M. (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol*, **8**, R196
- OIWA, K., Eccleston, J.F., Anson, M., Kikumoto, M., Davis, C.T., Reid, G.P., Ferenczi, M.A., Corrie, J.E., Yamada, A., Nakayama, H. und Trentham, D.R. (2000) Comparative single-molecule and ensemble myosin enzymology: sulfoindocyanine ATP and ADP derivatives. *Biophys J*, **78**, 3048-3071
- ONISHI, H., Mochizuki, N. und Morales, M.F. (2004) On the myosin catalysis of ATP hydrolysis. *Biochemistry*, **43**, 3757-3763
- ONISHI, H., Morales, M.F., Kojima, S., Katoh, K. und Fujiwara, K. (1997) Functional transitions in myosin: role of highly conserved Gly and Glu residues in the active site. *Biochemistry*, **36**, 3767-3772
- O'SHEA, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S. und Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, **254**, 539-544
- OSTAP, E.M. und Pollard, T.D. (1996) Overlapping functions of myosin-I isoforms? *J Cell Biol*, **133**, 221-224
- PATTON, C., Thompson, S. und Epel, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* **35**, 427-431
- PETERSON, M.D., Urioste, A.S. und Titus, M.A. (1996) *Dictyostelium discoideum* myoJ: a member of a broadly defined myosin V class or a class XI unconventional myosin? *J Muscle Res Cell Motil*, **17**, 411-424
- PITT, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R. und Devreotes, P.N. (1992) Structurally distinct and stage-specific adenyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell*, **69**, 305-315

- POLLARD, T.D. und Korn, E.D. (1973) *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem*, **248**, 4682-4690
- PURCELL, T.J., Sweeney, L. und Spudich, J.A. (2005). A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13873-13878
- RAPER, K.B. (1935) *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J Agr Res*, **50**, 135-147
- RAYMENT, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. und Holden, H.M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, **261**, 50-58
- REUBOLD, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F.J. und Manstein, D.J. (2003) A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol*, **10**, 826-830
- RIEF, M., Rock, R.S., Mehta, A.D., Mooseker, M.S., Cheney, R.E. und Spudich, J.A. (2000) Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9482-9486
- RITCHIE, M.D., Geeves, M.A., Woodward, S.K. und Manstein, D.J. (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8619-8623
- RIVERO, F. (2003) *Dictyostelium* als Modellorganismus *BIOspektrum*, **4**, 362-365
- RODGERS, D.W. (1994). Cryocrystallography. *Structure*, **2**, 1135-1140
- ROSENFELD, S.S., Houdusse, A. und Sweeney, H.L. (2005) Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J Biol Chem*, **280**, 6072-6079
- ROSENFELD, S.S. und Sweeney, H.L. (2004) A model of myosin V processivity. *J Biol Chem*, **279**, 40100-40111
- ROSENFELD, S.S., Xing, J., Whitaker, M., Cheung, H.C., Brown, F., Wells, A., Milligan, R.A. und Sweeney, H.L. (2000) Kinetic and spectroscopic evidence for three actomyosin:ADP states in smooth muscle. *J Biol Chem*, **275**, 25418-25426
- RUFF, C., Furch, M., Brenner, B., Manstein, D.J. und Meyhofer, E. (2001) Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol*, **8**, 226-229
- SACK, S., Müller, J., Marx, A., Thormählen, M., Mandelkow, E.M., Brady, S.T. und Mandelkow, E. (1997) X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry*, **36**, 16155-16165
- SAKAMOTO, T., Amitani, I., Yokota, E. und Ando, T. (2000) Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules. *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 586-590.
- SASAKI, N., Shimada, T. und Sutoh, K. (1998) Mutational analysis of the switch II loop of *Dictyostelium* myosin II. *J Biol Chem*, **273**, 20334-20340
- SELLERS, J.R., Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J.A. 3rd und Knight P.J. (2008) Calcium and cargoes as regulators of myosin 5a activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **369**, 176-181
- SELLERS, J.R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 3-22
- SENDA, S., Lee, S.F., Cote, G.P. und Titus, M.A. (2001) Recruitment of a specific amoeboid myosin I isoform to the plasma membrane in chemotactic *Dictyostelium* cells. *J Biol Chem*, **276**, 2898-2904

- SHIMADA, T., Sasaki, N., Ohkura, R. und Sutoh, K. (1997) Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Biochemistry*, **36**, 14037-14043
- SHIMMEN, T. und Yokota, E. (2004) Cytoplasmic streaming in plants. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 68-72
- SIEMANKOWSKI, R.F., Wiseman, M.O. und White, H.D. (1985) ADP dissociation from actomyosin subfragment 1 is sufficiently slow to limit the unloaded shortening velocity in vertebrate muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 658-662
- SIEMANKOWSKI, R.F. und White, H.D. (1984) Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J Biol Chem*, **259**, 5045-5053
- SMITH, C.A. und Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **35**, 5404-5417
- SOLDATI, T. (2003) Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic*, **4**, 358-366
- SPINK, B.J., Sivaramakrishnan, S., Lipfert, J., Doniach, S. und Spudich, J.A. (2008) Long single alpha-helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 591-597
- SPUDICH, J. A. und Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, **246**, 4866-4871
- STAVES, M.P., Wayne, R. und Leopold, A.C. (1995) Detection of gravity-induced polarity of cytoplasmic streaming in *Chara*. *Protoplasma*, **188**, 38-48
- STEFFEN, W. und Sleep, J. (2004) Repriming the actomyosin crossbridge cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 12904-12909
- SUMIYOSHI, H., Ooguchi, M., Ooi, A., Okagaki, T. und Higashi-Fujime, S. (2007) Insight into the mechanism of fast movement of myosin from *Chara corallina*. *Cell Motil Cytoskeleton*, **64**, 131-142
- SUSSMAN, R. und Sussman, M. (1967) Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem Biophys Res Commun*, **29**, 53-55
- SUZUKI, Y., Komatsu, H., Ikeda, T., Saito, N., Araki, S., Citterio, D., Hisamoto, D., Kitamura, Y., Kubota, T., Nakagawa, J., Oka, K. und Suzuki, K. (2002) Design and synthesis of Mg²⁺-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg²⁺ measurement in a living cell. *Anal Chem*, **74**, 1423-1428
- SWEENEY, H.L., Park, H., Zong, A.B., Yang, Z., Selvin, P.R. und Rosenfeld, S.S. (2007) How myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J*, **26**, 2682-2692
- TAFT, M.H., Hartmann, F.K., Rump, A., Keller, H., Chizhov, I., Manstein, D.J. und Tsiavaliaris, G. (2008) *Dictyostelium* myosin-5b is a conditional processive motor. *J Biol Chem*, **283**, 26902-26910
- TAFT, M. H. (2007) Mechanismus und Regulation eines prozessiven Klasse V Myosins
- THIRUMURUGAN, K., Sakamoto, T., Hammer, J.A., 3rd, Sellers, J.R. und Knight, P.J. (2006) The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature*, **442**, 212-215
- TITUS, M.A., Wessels, D., Spudich, J.A. und Soll, D. (1993) The unconventional myosin encoded by the myoA gene plays a role in *Dictyostelium* motility. *Mol Biol Cell*, **4**, 233-246

- TOMINAGA, M., Kojima, H., Yokota, E., Orii, H., Nakamori, R., Katayama, E., Anson, M., Shimmen, T. und Oiwa, K. (2003) Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *EMBO J*, **22**, 1263-1272
- TRENTHAM, D.R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F., und Weeds, A. G. (1972). Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay *in situ*. *Biochem J* **126**, 635-644
- TRYBUS, K.M., Kremmentsova, E. und Freyzon, Y. (1999) Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct. *J Biol Chem*, **274**, 27448-27456
- TSIAVALIARIS, G., Fujita-Becker, S., Durrwang, U., Diensthuber, R.P., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (2008) Mechanism, regulation, and functional properties of *Dictyostelium* myosin-1B. *J Biol Chem*, **283**, 4520-4527
- TSIAVALIARIS, G., Fujita-Becker, S. und Manstein, D.J. (2004) Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor. *Nature*, **427**, 558-561
- TSIAVALIARIS, G., Fujita-Becker, S., Batra, R., Levitsky, D.I., Kull, F.J., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (2002) Mutations in the relay loop region result in dominant-negative inhibition of myosin II function in *Dictyostelium*. *EMBO Rep*, **3**, 1099-1105
- TUXWORTH, R.I. und Titus, M.A. (2000) Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic*, **1**, 11-18
- TYSKA, M.J. und Mooseker, M.S. (2004) A role for myosin-1A in the localization of a brush border disaccharidase. *J Cell Biol*, **165**, 395-405
- URBANKE, C. und Wray, J. (2001) A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J*, **358**, 165-173
- VALE, R.D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol*, **135**, 291-302
- VAN DEN HEUVEL M.G. und Dekker, C. (2007) Motor proteins at work for nanotechnology. *Science* 2007 **317**, 333-336
- VAN DIJK, J., Furch, M., Lafont, C., Manstein, D.J. und Chaussepied, P. (1999) Functional characterization of the secondary actin binding site of myosin II. *Biochemistry*, **38**, 15078-15085
- VEIGEL, C., Schmitz, S., Wang, F. und Sellers, J.R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol*, **7**, 861-869
- VEIGEL, C., Wang, F., Bartoo, M.L., Sellers, J.R. und Molloy, J.E. (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol*, **4**, 59-65
- VEIGEL, C., Coluccio, L.M., Jontes, J.D., Sparrow, J.C., Milligan, R.A. und Molloy, J.E. (1999) The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*, **398**, 530-533
- VOLKMANN N, Hanein D, Ouyang G, Trybus KM, DeRosier DJ, Lowey S. (2000) Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nat Struct Biol*, **7**, 1147-1155.
- WALKER, M.L., Burgess, S.A., Sellers, J.R., Wang, F., Hammer, J.A., 3rd, Trinick, J. und Knight, P.J. (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*, **405**, 804-807

- WANG, Z. und Pesacreta, T.C. (2004) A subclass of myosin XI is associated with mitochondria, plastids, and the molecular chaperone subunit TCP-1 α in maize. *Cell Motil Cytoskeleton*, **57**, 218-232
- WANG F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E.V. und Sellers, J.R. (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem*, **278**, 27439-27448
- WANG, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E.V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer, J.A. 3rd und Sellers, J.R. (2000) Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J Biol Chem*, **275**, 4329-4335
- WARRICK, H.M. und Spudich, J.A. (1987) Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol*, **3**, 379-421
- WARSHAW, D.M., Kennedy, G.G., Work, S.S., Krementsova, E.B., Beck, S. und Trybus, K.M. (2005) Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity. *Biophys J*, **88**, L30-32
- WATANABE, S., Ikebe, R. und Ikebe, M. (2006) *Drosophila* myosin VIIA is a high duty ratio motor with a unique kinetic mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 7151-7160
- WATTS, D.J. und Ashworth, J.M. (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J*, **119**, 171-174
- WEISS, S., Chizhov, I. und Geeves, M. A. (2000). A Flash photolysis Fluorescence/light scattering apparatus for use with sub microgram quantities of muscle proteins. *J Muscle Res Cell Motil.* **21**, 423-432
- WENDT, T., Taylor, D., Trybus, K.M. und Taylor, K. (2001) Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4361-4366
- WHITE, H.D., Belknap, B. und Webb, M.R. (1997) Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate. *Biochemistry*, **36**, 11828-11836
- WOODWARD, S.K., Geeves, M.A. und Manstein, D.J. (1995) Kinetic characterization of the catalytic domain of *Dictyostelium discoideum* myosin. *Biochemistry*, **34**, 16056-16064
- YAMAMOTO, K., Shimada, K., Ito, K., Hamada, S., Ishijima, A., Tsuchiya, T. und Tazawa, M. (2006) Chara myosin and the energy of cytoplasmic streaming. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1427-31
- YANAGIDA, T., Iwaki, M. und Ishii, Y. (2008) Single molecule measurements and molecular motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **363**, 2123-2134
- YANG, Y., Gourinath, S., Kovacs, M., Nyitray, L., Reutzel, R., Himmel, D.M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Gyorgyi, A.G., Brown, J.H. und Cohen, C. (2007) Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure*, **15**, 553-564
- YANG, Y., Kovacs, M., Sakamoto, T., Zhang, F., Kiehart, D.P. und Sellers, J.R. (2006) Dimerized *Drosophila* myosin VIIa: a processive motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5746-5751
- YANG, Y., Kovacs, M., Xu, Q., Anderson, J.B. und Sellers, J.R. (2005) Myosin VIIB from *Drosophila* is a high duty ratio motor. *J Biol Chem*, **280**, 32061-32068

- YILDIZ, A., Forkey, J.N., McKinney, S.A., Ha, T., Goldman, Y.E. und Selvin, P.R. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, **300**, 2061-2065
- YIN, H., Pruyne, D., Huffaker, T.C. und Bretscher, A. (2000) Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, **406**, 1013-1015
- YOKOTA, E., McDonald, A.R., Liu, B., Shimmen, T und Palevitz, B.A. (1995) Association of myosin-11 with organelles in higher plants. *Protoplasma*, **185**, 178-187
- YU, H., Ma, L., Yang, Y. und Cui, Q. (2007) Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. I. Insights from equilibrium active-site simulations. *PLoS Comput Biol*, **3**, e21
- ZENG, W., Conibear, P.B., Dickens, J.L., Cowie, R.A., Wakelin, S., Malnasi-Csizmadia, A. und Bagshaw, C.R. (2004) Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1843-1855

KAPITEL VI

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

6.1 Publikationen

Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Dürrwang, U., Diensthuber, R.P., Geeves, M.A., und Manstein, D.J. (2008). Mechanism, regulation, and functional properties of *Dictyostelium* myosin-1B. *J Biol Chem.* **283** (8), 4520-4527

Diensthuber, R.P., Hartmann, F.K., Fedorov, R., Manstein, D.J., and Tsiavaliaris, G. (2008) Mechanism of switch-2 mediated ADP release in myosins. (in Vorbereitung)

Amrute-Nayak, M., Diensthuber, R.P., Kathmann, D., Fedorov, R., Steffen, W., Urbanke, C., Brenner, B., Manstein, D.J., and Tsiavaliaris, G., (2008) Engineering a processive artificial myosin. (in Vorbereitung)

6.2 Präsentationen

Poster, März 2006

Stipendien-Verleihung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften; Wien, Österreich.

“Functional Characterization of Myosin-IK and Myosin-M from *Dictyostelium discoideum*“

Vortrag, März 2007

12th Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007; Alpbach, Österreich.

“Conserved residues in the switch-II loop of myosin control Mg²⁺-coordination and ADP release”

Poster, März 2007

12th Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007; Alpbach, Österreich.

“Conserved residues in the switch-II loop of myosin control Mg²⁺-coordination and ADP release”

Poster, Februar 2008

52nd Annual Meeting of the Biophysical Society, Long Beach (CA), USA.

“Mechanism of Switch-2 Mediated Mg²⁺-Sensing in the Myosin Motor Domain”

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Ralph P. Diensthuber
Geburtsdatum/-ort: 11.08.1981 in Wien
Staatsbürgerschaft: österreichisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1987 – 07/1991 Volksschule Leobersdorf, Niederösterreich
09/1991 – 07/1997 Bundesgymnasium Berndorf, Niederösterreich
09/1997 – 07/2000 Sophienschule Hannover
07/2000 Abitur, Note 1.0

Studium

10/2000 – 06/2002 Grundstudium der Biochemie an der Universität Hannover
06/2002 Vordiplom, Note: Sehr gut
07/2002-08/2005 Hauptstudium der Biochemie an der Universität Hannover
01/2005 – 07/2005 Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
Thema: „Darstellung und Kristallisation von Myosin- Fusionsproteinen“
08/2005 Diplom, Note: Sehr gut

Promotionsstudium

09/2005-12/2008 Doktorarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
Thema: „Struktur-Funktionsanalysen prozessiver und nicht-prozessiver Myosine“
03/2006 – 02/2007 Stipendiat der Österreichischen Akademie der Wissenschaften